

Aus dem Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Rolf Müller
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

**Identifizierung von Kaiso Like 1 (Zbtb4) als
negativem Regulator der *P21CIP1*-Expression,
Interaktionspartner von Miz1 und
Histondeacetylasen sowie Modulator der zellulären
p53-Antwort**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Humanbiologie
dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

**Judith Schmitz, geb. Marquardt
aus Kassel**



Marburg, 2008

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
am: 24.07.2009

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. M. Rothmund

Referent: Prof. Dr. Martin Eilers

1. Korreferent: Prof. Dr. Thorsten Stiewe

Meinem Vater

1. ZIELSETZUNG DER ARBEIT	8
2. EINLEITUNG	9
2.1 Das Neuroblastom.....	9
2.1.1 Ursprung des Tumors	9
2.1.2 Ätiologie des Neuroblastoms.....	10
2.1.3 Therapie	10
2.2 p53.....	12
2.2.1 p53 im Neuroblastom	12
2.2.2 Struktur von p53.....	13
2.2.3 Kontrolle von p53.....	14
2.2.4 Aktivierung und Stabilisierung von p53.....	15
2.2.5 Hemmung der Zellproliferation und Induktion der Apoptose.....	15
2.3 p21Cip1	17
2.3.1 Antiproliferative Funktion von p21Cip1	18
2.3.2 Anti-apoptotische Funktion von p21Cip1	19
2.3.3 Expression und Funktion von p21Cip1 in Geweben.....	19
2.3.4 Regulatoren der <i>P21CIP1</i> -Transaktivierung	20
2.4 Miz1	21
2.4.1 Funktionen von Miz1	21
2.4.2 Zielgene von Miz1	21
2.4.3 Regulation der transkriptionellen Aktivität von Miz1	22
2.5 Histondeacetylasen.....	23
2.5.1 Einteilung der HDACs	23
2.5.2 HDAC-Aktivität in Krebszellen.....	24
2.5.3 HDAC-Inhibitoren	25
2.6 BTB/POZ-Proteine.....	25
2.7 Kaiso Like 1 (Zbtb4).....	26
2.7.1 Expression von Kaiso Like 1 (KL1) im Neuroblastom.....	26
2.7.2 KL1-Expression in soliden Tumoren	28
2.7.3 KL1-Expression im Gewebe und in Zelllinien	28
3. ERGEBNISSE	30
3.1 Herstellung der Konstrukte.....	30
3.2 Analyse der Überexpression von KL1 in verschiedenen Zelllinien	30
3.2.1 Die Überexpression von KL1 mit anschließender Selektion ist zytotoxisch für Neuroblastomzelllinien.....	30
3.2.2 Die Überexpression von KL1 mit anschließender Selektion ist auch für andere Zelllinien zytotoxisch	32
3.2.3 Nachweis der KL1-Expression	33
3.2.4 KL1-Überexpression induziert Apoptose	35
3.3 KL1 ist chromatingebunden im Nukleus lokalisiert	37
3.4. KL1 als transkriptioneller Repressor	40
3.5 KL1 interagiert mit den Histondeacetylasen HDAC2 und HDAC6.....	41
3.6 Behandlung von <i>KL1</i> -depletierten SH-EP-Zellen mit Chemotherapeutika	43
3.7 Resistenz <i>KL1</i> -depletierter Zellen gegenüber niedrig dosiertem Vincristin	46

3.8 <i>KL1</i> -depletierte Zellen arretieren in der G1-Phase unter der Behandlung mit niedrig dosiertem Vincristin	47
3.9 Niedrig dosiertes Vincristin aktiviert p53-Zielgene	48
3.10 <i>KL1</i> reprimiert die Expression von <i>P21CIP1</i>	49
3.11 Die Expression von <i>P21CIP1</i> trägt zur Resistenz <i>KL1</i> -depletierter Zellen gegenüber Vincristin bei	53
3.12 <i>KL1</i> überexprimierte Zellen reagieren unempfindlich auf eine p53-Aktivierung durch Nutlin-3	55
3.13 <i>KL1</i> reprimiert unabhängig von p53 die Expression von <i>P21CIP1</i>	59
3.14 <i>KL1</i> hemmt die Miz1 vermittelte Transaktivierung von <i>P21CIP1</i> und bindet an den <i>P21CIP1</i> -Promotor <i>in vitro</i>	60
3.15 <i>KL1</i> bindet an den <i>P21CIP1</i> -Promotor <i>in vivo</i>	63
3.16 Die Repression der Transaktivierung von <i>P21CIP1</i> durch <i>KL1</i> ist abhängig von der Histondeacetylase-Aktivität	64
3.17 Interaktionsstudie von <i>KL1</i> und Miz1	66
3.17.1 <i>KL1</i> -Antikörper	66
3.17.2 Exogener Interaktionsnachweis zwischen <i>KL1</i> und Miz1	67
3.17.3 <i>KL1</i> und Miz1 interagieren auch unter Ethidiumbromid	68
3.17.4 <i>KL1</i> interagiert mit endogenem Miz1	69
3.17.5 Die POZ-Domäne von Miz1 ist für die Interaktion mit <i>KL1</i> nicht essentiell	69
3.18 <i>KL1</i> interagiert mit Miz1 und HDAC2 bzw. HDAC6	70
3.19 <i>KL1</i> interagiert mit Miz1 und Myc	71
3.20 Suche nach weiteren <i>KL1</i> -Zielgenen mittels Microarray-Analyse	72
4. DISKUSSION	74
4.1 Kaiso Like 1 – neuer Interaktionspartner von Miz1	74
4.2 Kaiso Like 1 – transkriptioneller Repressor der <i>P21CIP1</i> -Expression	76
4.3 <i>KL1</i> inhibiert die <i>P21CIP1</i> -Expression durch Interaktion mit HDACs	78
4.4 <i>KL1</i> – Modulator der p53-Antwort	81
4.4.1 Spezifische Resistenz <i>KL1</i> -depletierter Zellen gegenüber niedrig dosiertem Vincristin	81
4.4.2 Niedrig dosiertes Vincristin aktiviert p53, induziert aber keine p53 DNA-Schadensantwort	82
4.4.3 <i>KL1</i> blockiert spezifisch den p53 induzierten G1-Arrest durch Repression der Transaktivierung von <i>P21CIP1</i>	83
4.4.4 <i>KL1</i> hemmt die Transaktivierung der <i>P21CIP1</i> -Expression unabhängig von p53	86
4.5 <i>KL1</i> – Tumorsuppressor oder Onkogen?	89
4.5.1 Tumorsuppressive Funktionen	89
4.5.2 Onkogene Funktionen	90
4.6 Weitere mögliche Funktionen von <i>KL1</i>	93
5. ZUSAMMENFASSUNG	94
6. SUMMARY	96
7. MATERIAL	98

7.1 MATERIALIEN FÜR DIE ZELLKULTUR	98
7.1.1 Zelllinien.....	100
7.2 MATERIALIEN FÜR DIE ZELLBIOLOGIE.....	101
7.2.1 Transfektion.....	101
7.2.2 Infektion.....	101
7.2.3 Kristallviolett-Färbung	101
7.2.4 FACS-Analyse	101
7.2.5 Reagenzien für die Immunofluoreszenz	101
7.3 MATERIALIEN FÜR DIE MOLEKULARBIOLOGIE	102
7.3.1 Bakterienstämme.....	102
7.3.2 DNA-Vektoren.....	102
7.3.3 DNA modifizierende Enzyme.....	103
7.3.4 Medium für die Bakterienkultur	103
7.3.5 Minipräparation von Plasmid-DNA aus Bakterien	103
7.3.6 Maxipräparation von Plasmid-DNA aus Bakterien	104
7.3.7 Gelextraktion bzw. Aufreinigung eines PCR-Produktes.....	104
7.3.8 Agarosegel	104
7.3.9 RNA-Isolierung (Zelllinien)	104
7.3.10 RNA-Isolierung (Primärtumorgewebe).....	104
7.3.11 c-DNA Synthese mit Random Primern	104
7.3.12 PCR.....	105
7.3.13 shRNA Oligonukleotide:	106
7.4 MATERIALIEN FÜR DIE BIOCHEMIE	107
7.4.1 Lysepuffer für die Herstellung von Zelllysaten	107
7.4.2 Proteinbestimmung nach Bradford.....	108
7.4.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	108
7.4.4 Reagenzien für nicht-denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese...	109
7.4.5 Reagenzien für Western-Blot-Analyse.....	109
7.4.6 Antikörper.....	109
7.4.7 Reagenzien für die Co-Immunopräzipitation	110
7.4.8 Reagenzien für Native Chromatinisolierung	111
7.4.9 Reagenzien für die Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP)	111
7.4.10 Reagenzien für Oligonukleotid-Pulldown	112
7.4.11 Oligonukleotide für Oligonukleotid-Pulldown	112
7.4.12 Reagenzien für Reporter-Assay	113
8. METHODEN	114
8.1 ZELLKULTUR	114
8.1.1 Allgemeine Zellkulturbedingungen.....	114
8.1.2 Passagieren von Zellen.....	114
8.1.3 Auftauen von Zellen.....	114
8.1.4 Einfrieren von Zellen.....	115
8.1.5 Bestimmung der Zellzahl.....	115
8.1.6 Wachstumskurve	115
8.1.7 Picken von Zellklonen.....	115
8.1.8 Behandlung von Zellen mit Zytostatika	115
8.1.9 Bestrahlung von Zellen mit UV	116
8.1.10 “colony formation”-Assay	116
8.1.11 Herstellung von KL1 induzierbaren SHEP-Zellklonen.....	116

8.2 ZELLBIOLOGISCHE METHODEN	117
8.2.1 Transfektion und Virusernte von Verpackungszelllinien	117
8.2.2 Infektion von Zellen	118
8.2.3 Transfektion mit Lipofectamin RNAiMax	118
8.2.4 PI-FACS-Analyse zur Bestimmung des DNA-Gehaltes von Zellen	119
8.2.5 BrdU-PI-FACS-Analyse des DNA-Gehaltes von Zellen	119
8.2.6 Lebend-GFP-FACS-Analyse	120
8.2.7 Lebend-PI-FACS-Analyse	120
8.2.8 Immunofluoreszenz	120
8.3 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	121
8.3.1 Schneiden von DNA mit Restriktionsenzymen	121
8.3.2 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten	121
8.3.3 Aufreinigung von DNA-Fragmenten	122
8.3.4 Ligation	122
8.3.5 Transformation von Bakterien durch Hitzeschock	122
8.3.6 Minipräparation von Plasmid-DNA aus Bakterien	122
8.3.7 Maxipräparation von Plasmid-DNA aus Bakterien	123
8.3.8 Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA	123
8.3.9 RNA-Isolierung mit peqGOLD TriFast-Reagenz	123
8.3.10 RT-PCR	123
8.3.11 PCR	124
8.3.12 qPCR	124
8.4 BIOCHEMISCHE METHODEN	125
8.4.1 Herstellung von Proteinlysaten aus kultivierten Zellen	125
8.4.2 Proteinbestimmung nach Bradford	126
8.4.3 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	126
8.4.4 Western-Blotting	127
8.4.5 Nuklearextrakt	128
8.4.6 Native Chromatinisolierung	128
8.4.7 Co-Immunopräzipitation	129
8.4.8 Chromatinimmunopräzipitation (ChIP)	130
8.4.9 Oligonukleotid-Pulldown	132
8.4.10 Reporter-Assay	133
8.4.11 cDNA-Microarray	134
9. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	136
10. LITERATURVERZEICHNIS	143
11. MICROARRAY-LISTEN	160
12. AKADEMISCHE LEHRER	169
13. DANKSAGUNG	170
14. EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG	171

1. ZIELSETZUNG DER ARBEIT

Neuroblastome sind die häufigsten extrakranialen, soliden Tumoren und die zweithäufigsten bösartigen Neubildungen, die bei Kindern auftreten. Die Ätiologie des Tumors ist nach wie vor ungeklärt. In einem von unserer Arbeitsgruppe durchgeführten Microarray wurde das Genexpressionsprofil von 95 Neuroblastom-Tumorproben unterschiedlicher Stadien untersucht. Hierbei wurde Kaiso Like 1 (KL1) entdeckt. Das neu identifizierte Gen zeigte ein herunterreguliertes Expressionsprofil in Tumoren, die mit einer schlechten Prognose einhergehen, im Vergleich zu Tumoren mit einer guten Prognose. Ziel der vorliegenden Doktorarbeit war es, KL1 näher zu charakterisieren, hierbei Interaktionspartner und Zielgene sowie eine mögliche biologische Funktion zu entdecken.

2. EINLEITUNG

2.1 Das Neuroblastom

2.1.1 Ursprung des Tumors

Neuroblastome sind embryonale Tumoren. Ihre Zellen, die Neuroblasten, verharren in einem unreifen Stadium. Die Tumoren treten vor allem in den Nebennieren auf bzw. sind paraspinal im Bereich des Abdomen oder der Brust lokalisiert. Sie entstammen Vorläuferzellen des peripheren sympathischen Nervensystems sowie der adrenalen Medulla, die der Neuralleiste entspringen (Bolande RP et al., 1974). Die Neuralleiste bildet sich aus der dorsalen Oberfläche des Neuralrohres und generiert eine Population von multipotenten embryonalen Zellen. Diese migrieren entlang definierter „Bahnen“ in dem sich entwickelnden Embryo. Aus ihnen bilden sich unterschiedliche Zelltypen wie beispielsweise periphere Neuronen und Gliazellen. Intrinsische und extrinsische Faktoren vor, während und nach der Wanderung von Neuralleistenzellen entscheiden darüber, in welche Zelltypen sich diese entwickeln (LaBonne C und Bronner-Fraser M, 1999).

Für die Entwicklung der sympathischen Neuronen und Chromaffinzellen der Nebenniere, die als modifizierte Nervenzellen betrachtet werden und im Stresszustand Adrenalin und Noradrenalin erzeugen (Speidel D et al., 2005), werden derzeit in der Literatur zwei Modelle vorgeschlagen: Das eine Modell geht von einer bipotenten sympathoadrenalen Vorläuferzelle aus, die sich aus denjenigen Neuralleistenzellen entwickelt, welche sich an der dorsalen Aorta angesammelt haben (Anderson DJ und Axel R, 1981; Anderson DJ et al., 1991). Beeinflusst durch Faktoren aus der Mikroumgebung erwerben diese Zellen neuronale und catecholaminerge Eigenschaften. Zu den Faktoren zählen BMPs, die von Zellen der dorsalen Aortenwand produziert werden (Reissmann E et al., 1996; Schneider C et al., 1999; Shah NM et al., 1996) sowie Transkriptionsfaktoren wie HASH-1 und Phox2a/b (Guillemot F et al., 1993; Pattyn A et al., 1999). Von der dorsalen Aorta ausgehend wandern die sympathoadrenalen Vorläuferzellen anschließend zu ihrem Bestimmungsort, den sympathischen Ganglien und der Nebenniere, wo sie sich zu sympathischen Neuronen bzw. Chromaffinzellen differenzieren (Anderson DJ und Axel R, 1986; Anderson DJ et al., 1991). Letztere regulieren hierzu ihre neuronalen Marker herunter (Langley K und Grant NJ, 1999).

Nach dem zweiten Modell existiert keine bipotente sympathoadrenale Vorläuferzelle. Durch den Einfluss von BMPs bilden sich an der dorsalen Aorta neuronale Vorläuferzellen und im periadrenalen Gewebe chromaffine Vorläuferzellen. Beide Vorläuferzellen entwickeln sich durch weitere Faktoren zu sympathischen Neuronen bzw. Chromaffinzellen (Huber K, 2006).

2.1.2 Ätiologie des Neuroblastoms

Die Ätiologie des Neuroblastoms ist ungeklärt. Es wird davon ausgegangen, dass die Erkrankung durch einen Defekt mehrerer Gene verursacht wird (Maris JM et al., 2005; Longo L et al., 2005). Ein wichtiger von den bisher bekannten molekulargenetischen Faktoren, welche die Neuroblastomerkkrankung beeinflussen, ist das Onkogen *MYCN*. Es ist in einem Teil der aggressiven Tumoren amplifiziert und geht mit einer Tumorprogression und schlechten Prognose einher (Brodeur GM, 2003). Weitere Faktoren sind die Tyrosinrezeptorkinasen TrkA und TrkB, die an der Entwicklung der sympathischen Neuronen beteiligt sind. TrkA ist in gut prognostischen Neuroblastomen stark exprimiert, seine Expression ist in schlecht prognostischen herunterreguliert. TrkB wird besonders in aggressiven Neuroblastomen mit *MYCN*-Amplifikation exprimiert (Brodeur GM et al., 1997). Auch eine erhöhte Expression von hTert, der katalytischen Untereinheit der Telomerase, wird in schlecht prognostischen Tumoren mit *MYCN*-Amplifikation oder Chromosom 1p Deletion beobachtet (Hiyama E et al., 1995). Auf eine genetische Prädisposition gehen vermutlich weniger als fünf Prozent der Neuroblastomerkkrankungen zurück (Bourdeaut F et al., 2005). Zwei genomische Regionen wurden als Prädispositionsloki für familiäres Neuroblastom auf den Chromosomen 2p und 12p identifiziert (Longo L et al., 2007). Eine Keimbahnmutation von *PHOX2B* wurde in wenigen Familien mit einer Neuroblastomerkkrankung entdeckt (Bourdeaut F et al., 2005).

2.1.3 Therapie

Charakteristisch für das Krankheitsbild des Neuroblastoms ist seine klinische und biologische Heterogenität. Einige Tumoren bilden sich unbehandelt spontan zurück, andere sind resistent gegenüber jeglicher Therapie. Anhand bestimmter Kriterien wie der Stadieneinteilung nach dem INSS (**s. Textbox 1**), dem Alter des Patienten bei Erstdiagnose, der Histopathologie des Tumors, dem DNA-Index sowie molekulargenetischen Untersuchungen – wie beispielsweise nach dem Vorliegen einer *MYCN*-

Amplifikation oder Chromosom 1p-Deletion – werden die Tumoren in Gruppen mit niedrigem, mittlerem oder hohem Risiko eingeteilt, nach denen sich die Therapie richtet (Maris JM 2005). Bei den Patienten mit einem niedrigen Risiko wird der Tumor operativ entfernt. In wenigen Fällen folgt eine Chemotherapie. Diese Patienten haben eine Heilungsrate von über 90 Prozent. Auch bei Neuroblastom-Patienten mit mittlerem Risiko wird der Tumor operativ entfernt. Anschließend folgt eine Chemotherapie. Patienten dieser Risikogruppe haben eine Heilungsrate von 70 bis 90 Prozent. Neuroblastom-Patienten mit hohem Risiko erhalten zunächst eine Chemotherapie. Spricht der Patient auf diese an, wird versucht, den primären Tumor operativ zu entfernen, gefolgt von einer myeloablativen hoch dosierten Chemotherapie mit autologer Stammzelltransplantation und ggf. einer Ganzkörperbestrahlung. Die Langzeit-Überlebensrate liegt hier nur zwischen 10 und 40 Prozent. Die Prognose und Behandlung von Neuroblastomen, die nach der Behandlung wiederauftreten, hängt von verschiedenen Faktoren wie den biologischen Charakteristika des Tumors ab. Insbesondere Patienten, deren Erst-Erkrankung als hoch risikoreich eingestuft wurde, haben bei einem Rückfall trotz Behandlung u.a. mit einer Kombination aus hoch dosierten Chemotherapeutika eine sehr schlechte Prognose (NB2004 trial protocol, Deutschland und National Cancer Institute, USA).

„International Neuroblastoma Staging System“ (INSS, Brodeur GM et al., 1993)

Stadium 1: Der Tumor ist auf seinen Ursprungsort begrenzt.

Stadium 2A: Der lokale Tumor konnte nur inkomplett entfernt werden, Lymphknoten sind nicht befallen.

Stadium 2B: Der lokale Tumor infiltriert die Umgebung, ohne die sagittale Mittellinie zu überschreiten, eventuell homolateraler Lymphknotenbefall.

Stadium 3: Der Tumor überschreitet die sagittale Mittellinie, regionale Lymphknoten können beidseits befallen sein.

Stadium 4: Hämatogene Fernmetastasen sind vorhanden.

Stadium 4S: Wie Stadium 1 oder Stadium 2, aber mit Fernmetastasen in Leber und Haut. Diese dürfen dabei nur minimal auf das Knochenmark übergreifen. Stadium 4S tritt nur im Säuglingsalter auf. Der Tumor kann sich spontan zurückbilden.

Bei dieser Klassifikation muss beachtet werden, dass die „Stadien“ separate, voneinander unabhängige Krankheitsbilder darstellen: Ein Patient kann am Neuroblastom Stadium 2 erkrankt sein, ohne zuvor das Stadium 1 durchlaufen zu sein (Prof. Dr. Holger Christiansen, persönliche Kommunikation).

Textbox 1: Stadieneinteilung nach dem INSS

2.2 p53

2.2.1 p53 im Neuroblastom

Die Ausschaltung der p53-Tumorsuppressorfunktion ist ein wichtiger in der Literatur diskutierter Mechanismus, der zur Resistenz gegenüber Chemotherapeutika führen kann (neben der Diskussion um sich langsam teilende Tumorstammzellen). p53 kontrolliert negativ die Zellproliferation nach DNA-Schaden, der beispielsweise durch Chemotherapeutika verursacht wird, oder nach Onkogenaktivierung. Die Ausschaltung der p53-Tumorsuppressor-Funktion ist daher für die Entstehung, aber auch für das Fortbestehen des Tumors wichtig (Levine AJ, 1997; Martins CP et al., 2006; Xue W et al., 2007; Ventura A et al., 2007). In einigen Tumoren ist die Ausschaltung der p53 vermittelten Apoptose besonders wichtig. Dies zeigt ein E μ -Myc transgenes Mausmodell. In diesen Mäusen werden durch die Expression des Onkogens cMyc Lymphome induziert. Während der Entwicklung dieser Lymphome ist die p53 abhängige Apoptose die einzige p53-Funktion, gegen die in den Tumorzellen selektioniert wird. Eine Verhinderung der Apoptose durch die Expression des anti-apoptotischen Proteins Bcl-2 oder durch die Expression einer dominant negativen Form der pro-apoptotischen Caspase 9 hebt den Selektionsdruck gegen den Verlust von p53 auf (Schmitt CA et al., 2002). Die Ausschaltung des p53-Tumorsuppressor-Signalweges wird in vielen Krebsarten dadurch erzielt, dass p53 durch Mutationen inaktiviert wird (Sherr CJ und McCormick F, 2002). Im Gegensatz dazu gehören Neuroblastome zu den Krebsarten mit p53-Wildtypstatus. Primäre Neuroblastome tragen in weniger als zwei Prozent der Fälle p53-Mutationen (Carr J et al., 2006). Auch viele Neuroblastomzelllinien sind p53-Wildtyp, wie beispielsweise die Zelllinie SH-EP, die aus Tumorgewebe nach dem Rückfall eines Patienten etabliert wurde, der mit Chemotherapeutika behandelt wurde (Carr J et al., 2006). Selbst hoch mitogene Neuroblastome mit *MYCN*-Amplifikation exprimieren Wildtyp p53. Zur Unterdrückung des apoptotischen p53-Signalweges wird für diese Tumoren eine Kooperation zwischen MycN, das proliferative und pro-apoptotische Eigenschaften besitzt, und Twist-1 vorgeschlagen. Twist-1 ist ein Protein, das wie Myc zur Familie der bHLH-Proteine gehört, und dessen Überexpression mit einer *MYCN*-Amplifikation im Neuroblastom assoziiert ist. MycN fördert die Zellproliferation, während Twist-1 die pro-apoptotischen Eigenschaften von MycN durch Hemmung des p14ARF/p53-Signalweges (s.u.) unterbindet (Puisieux A et al., 2006). Daneben werden in der Literatur weitere Faktoren disku-

tiert, die zu einer funktionellen Inaktivierung des p53-Tumorsuppressor-Signalweges im Neuroblastom führen. Diese stehen im Zusammenhang mit chromosomalen Aberrationen, die bei dieser Erkrankung beobachtet werden und bei der Risikoeinteilung herangezogen werden. Hierzu zählen die erwähnte Deletion am Chromosom 1p sowie die Deletion am Chromosom 14q, aber auch ein Gewinn von genetischem Material an den Chromosomen 11q und 17q. So wurde für das Chromosom 1p36 das Tumorsuppressorgen *CHD5* identifiziert, welches vermutlich beim Neuroblastom und weiteren Krebserkrankungen deletiert ist (Bagchi A et al., 2007). Chd5 moduliert unter anderem über die Regulation der Transaktivierung am *INK4/ARF*-Genlokus die Funktion von p53. Als eine mögliche Ursache für den Gewinn an genetischem Material auf Chromosom 17q wird die Amplifikation des Survivin-Genlokus (17q25) diskutiert (Islam A et al., 2000, Tajiri T et al., 2006). Survivin gehört zur Familie der IAP (*inhibitor of apoptosis*), und seine Expression wird in gesunden Zellen transkriptionell durch p53 inhibiert. Eine Amplifikation des Survivin-Genlokus könnte dazu beitragen, dass p53 die Expression des anti-apoptotischen Genes nicht mehr unterdrücken kann.

2.2.2 Struktur von p53

Das Protein p53 wurde in Komplexen mit den viralen Onkoproteinen Simian Virus 40 large T Antigen und Adenovirus Typ 5 E1B entdeckt. Die Interaktion von p53 mit diesen Proteinen führt zu seiner funktionellen Inaktivierung (Linzer DI und Levine AJ, 1979; Sarnow P et al., 1982).

Wie in **Abbildung 1** dargestellt, besteht das Protein p53 aus 393 Aminosäuren mit einer N-terminalen Transaktivierungsdomäne. Über diese interagiert p53 mit regulatorischen Proteinen wie beispielsweise Hdm2, Komponenten des Transkriptionsinitiationskomplexes und Coaktivatoren, wie der Acetyltransferase p300, die durch Acetylierung des C-Terminus die Funktion von p53 reguliert. Gefolgt wird diese Domäne von einer prolinreichen Region, die ein SH3-Domänen-Bindungsmotiv (PXXP) enthält und vermutlich eine regulatorische Rolle ausübt, einer zentralen DNA-Bindungsdomäne, über die p53 als Tetramer an DNA-response-Elemente bindet, einer Tetramerisierungsdomäne und einer negativen regulatorischen Domäne am C-Terminus, welche die Acetylierungsstellen enthält und DNA unspezifisch binden kann (aus Bode AM und Dong Z 2004; Joerger AC und Fersht AR, 2007). Zur Proteinfamilie gehören neben p53 die Proteine p63 und p73 (Yang A et al., 1998; Kaghad M et al., 1997).

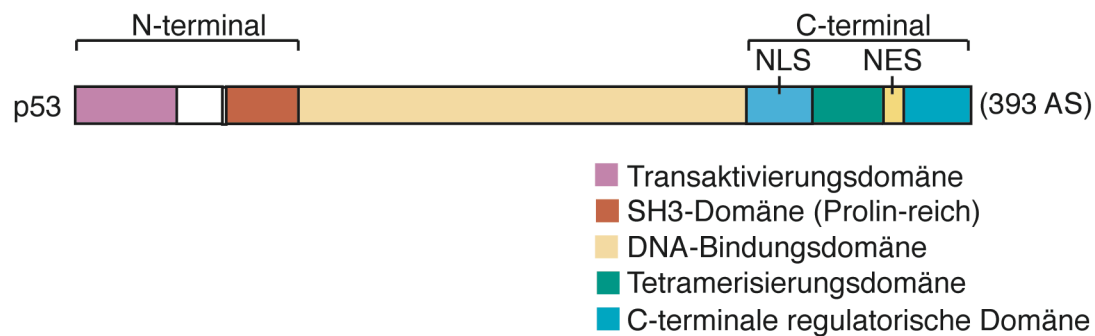


Abb. 1: Struktur des p53-Proteins

(NLS: nukleäre Lokalisierungssequenz; NES: nukleäre Exportsequenz; AS: Aminosäure)

2.2.3 Kontrolle von p53

Die Aktivität des Tumorsuppressors p53 wirkt stark inhibierend auf das Zellwachstum. Die Menge an Protein und seine Funktion werden daher in ungestressten Zellen negativ kontrolliert. Zu den zahlreichen Kontrollmechanismen gehören die Regulation der Stabilität, der Proteinaktivität und der subzellulären Lokalisation (Vousden KH und Lane DP, 2007). Die transkriptionelle Aktivität von p53 wird unter anderem durch Co-Aktivatoren beeinflusst. Beispielsweise regulieren Kinasen und Acetyltransferasen über Phosphorylierung und Acetylierung die Proteinaktivität von p53. Ubiquitin-Ligasen wie Hdm2 sind an der Regulation der Stabilität von p53 beteiligt. Hdm2, selbst aktiviertes Zielgen von p53, inaktiviert p53 zum einen als Transkriptionsfaktor durch Bindung an dessen Transaktivierungsdomäne. Zum anderen ubiquitiniert Hdm2 p53, und markiert dieses dadurch für den Abbau durch das Proteasom im Zytoplasma. Die subzelluläre Lokalisation von p53 wird ebenfalls kontrolliert, da p53 je nach Lokalisation unterschiedliche Aufgaben wahrnimmt. So vermittelt p53 beispielsweise am Mitochondrium transkriptionell unabhängige Apoptose (Marchenko ND et al., 2000; Mihara M et al., 2003). Im Zellkern reguliert der Transkriptionsfaktor p53 seine Zielgene. Nukleärer Import und Export werden daher reguliert (Vousden KH und Woude GF, 2000). Entlang des Mikrotubuli-Netzwerkes, insbesondere durch Interaktion mit dessen molekularen Motorprotein Dynein wird p53 in Richtung Nukleus transportiert (Giannakakou P et al., 2000). Dort erkennen Importrezeptoren die C-terminale nukleäre Lokalisierungssequenz von p53 und vermitteln den aktiven Import in den Nukleus. Der nukleäre Export von p53 ins Zytoplasma wird über sein nukleäres Exportsignal vermittelt. Als Auslöser hierfür wird die Hdm2 vermittelte Ubiquitinierung von p53 vermutet, die im Nukleus erfolgen kann (Boyd SD

et al., 2000; Geyer RK et al., 2000; Vousden KH und Woude GF, 2000; Stommel JM et al., 1999; Roth J et al., 1998).

2.2.4 Aktivierung und Stabilisierung von p53

DNA-Schäden in Form von Einzel- oder Doppelstrangbrüchen induzieren eine Stabilisierung von p53. Beispielsweise verursachen ionisierende Strahlen einen Doppelstrangbruch in der DNA. Dadurch wird eine ATM/Chk2-Signalkaskade ausgelöst, in deren Zuge p53 durch Phosphorylierung stabilisiert und aktiviert wird (ATM phosphoryliert p53 an p53Ser15, Chk2 an p53Ser20) (Khanna KK et al., 1998; Sluss HK et al., 2004; Abraham RT, 2001). Die Phosphorylierung blockiert die Interaktion zwischen p53 und Hdm2; p53 wird stabilisiert und kann sich aus seiner Bindung mit Hdm2 lösen (Vousden KH, 2000). Zudem kann Hdm2 durch die ATM vermittelte Phosphorylierung inaktiviert werden. Ein weiterer Gegenspieler von Hdm2 ist der Tumorsuppressor p14ARF. Nach onkogenem Stress – beispielsweise verursacht durch das Onkogen Myc – wird die Transaktivierung von p14ARF induziert. Das p14ARF-Protein kann direkt mit p53 und Hdm2 in einem ternären Komplex interagieren (Zindy F et al., 1998) und dabei den proteasomalen Abbau von Hdm2 induzieren. Hierdurch wird p53 ebenfalls stabilisiert und aktiviert (Pomerantz J. et al., 1998; Zhang Y et al., 1998; Kamijo T et al., 1998). Zudem kann p53 direkt über HAUSP, der Herpesvirus-assoziierten-Ubiquitin-spezifischen-Protease, in Gegenwart von Hdm2 deubiquitiniert und damit stabilisiert werden (Li M et al., 2002).

2.2.5 Hemmung der Zellproliferation und Induktion der Apoptose

Abhängig von Zelltyp, Interaktionspartnern und Modifikationen leitet p53 nach seiner Aktivierung und Stabilisierung Zellzyklusarrest oder Apoptose (Evan GI und Vousden KH, 2001; Martins CP et al., 2006; Vousden KH, 2006) bzw. Zellzyklusarrest mit anschließender Seneszenz ein (Ventura A et al., 2007; Xue W et al., 2007). Die Unterbindung der p53-Funktion ist nicht nur für die Entstehung des Tumors, sondern auch für das Fortbestehen des Tumors notwendig. In drei verschiedenen Mausmodellen führte die Wiederherstellung der p53-Funktion zur Rückbildung des Tumors (Martins CP et al., 2006; Xue W et al., 2007; Ventura A et al., 2007).

Den Zellzyklusarrest vermittelt p53 durch die Transaktivierung des Zyklin-abhängigen-Kinase-Inhibitors *P21CIP1* (s. **Einleitung 2.3**) (El-Deiry WS et al., 1993) und durch die Hemmung von *CDC25C*, einer Phosphatase, die für die Aktivierung der

Zyklin-abhängigen-Kinase 1 (Cdk1) benötigt wird (St Clair S et al., 2004). p53 vermittelt Apoptose durch die Transaktivierung von pro-apoptotischen Genen wie *BAX*, *PUMA* und *NOXA*. Transkriptionell unabhängige Apoptose vermittelt p53 am Mitochondrium – ähnlich den pro-apoptotischen BH3-only-Proteinen Bid und Bim – durch Bindung an anti-apoptotische Bcl-2-Proteine wie Bcl-XL. Hierdurch wird das durch Bcl-XL gebundene pro-apoptotische Bcl-2-Protein Bax von diesem freigesetzt und aktiviert (Mihara M et al., 2003; Leu JI et al., 2004; Chipuk JE et al., 2004). Das apoptotische Programm wird durch die mitochondrielle Freisetzung von Zytocrom C und darauf folgende Aktivierung der Caspase-Kaskade fortgeführt (Schuler M et al., 2000). Ob p53 Zellzyklusarrest oder Apoptose vermittelt, hängt von verschiedenen Faktoren ab wie beispielsweise:

1. Affinität der p53-Bindung an die Promotoren

Geringe Mengen an p53-Protein führen zu Zellzyklusarrest, hohe Mengen an p53-Protein zu Apoptose, weil die Promotoren der apoptotischen Zielgene p53 mit niedrigerer Affinität binden als der *P21CIP1*-Promotor und somit nur aktiviert werden, wenn p53 stark induziert oder länger aktiv ist (Vousden KH, 2000).

2. Onkogen vermittelte Aktivierung von p53

Onkogene wie Myc und E2F1 können p53 über die Induktion der Expression von *P14ARF* aktivieren (Lowe SW und Sherr CJ, 2003). Die Menge an p53 erhöht sich und damit seine Affinität zu den apoptotischen Promotoren. Gleichzeitig hemmt Myc über die Bindung an Miz1 (**s. Einleitung 2.4**) die Transaktivierung von *P21CIP1*. Für die Kolonkarzinomzelllinie HCT116 wurde gezeigt, dass dies nicht die Bindung von p53 an den *P21CIP1*-Promotor *per se*, aber die p53 vermittelte Transaktivierung von *P21CIP1* hemmt. Die transkriptionelle Aktivierung von *PUMA* durch p53 erfolgt weiterhin, so dass Puma durch die erniedrigten Proteinmengen an p21Cip1 das apoptotische Programm einleiten kann (Seoane J et al., 2002).

3. post-translationale Modifikationen von p53

Die Phosphorylierung von p53 an Serin 46 durch HIPK2 wird durch DNA-Schadenssignale induziert (Di Stefano V, et al., 2004; D’Orazi G, 2002). Diese phosphorylierte Form von p53 ist effektiver in der Transaktivierung des pro-apoptotischen Genes

P53AIP1 (Oda K et al., 2000), kann jedoch nicht mehr die Expression von *P21CIP1* induzieren. Auch auf diese Weise wird der pro-apoptotische Signalweg aktiviert.

4. Interaktion mit weiteren Proteinen

Die Co-Expression von p300 und JMY erhöht die Bindungsaffinität von p53 an den *BAX*-Promotor, nicht aber an den *P21CIP1*-Promotor (Shikama N et al., 1999). Und auch die ASPP-Familie (Samuels-Lev Y et al., 2001) reguliert selektiv die pro-apoptotische, nicht aber die Zellzyklusarrest-Funktion von p53 (Trigiante G und Lu X, 2006).

2.3 p21Cip1

P21CIP1 wurde als Zielgen entdeckt, durch welches p53 Tumorsuppression vermittelt (El-Deiry WS et al., 1993). Es ist ein Inhibitor der Zyklin-abhängigen-Kinasen in der G1-Phase (Harper JW et al., 1993). Daher wird *P21CIP1* auch Zyklin-abhängiger-Kinase-Inhibitor-1A (*CDKN1A*) oder Wildtyp-p53-aktivierendes-Fragment-1 (*WAF1*) genannt. Des Weiteren wurde *P21CIP1* als ein Gen identifiziert, dass in seneszenten Zellen hochreguliert ist (Noda AY et al., 1994). In Zelllinien wurde gezeigt, dass p21Cip1 zum einen die Zellzyklusprogression verhindert und zum anderen Seneszenz vermittelt, indem sein N-Terminus an die ZyklinE assoziierte Zyklin-abhängige-Kinase 2 (Cdk2) bindet und dadurch inaktiviert (Chen J et al., 1995). Inwieweit dieses Modell für die p21Cip1 vermittelte Inhibition der Proliferation Gültigkeit hat, wird derzeit überdacht, da mehrere wissenschaftliche Arbeitsgruppen zeigen konnten, dass Cdk2-defiziente Mäuse lebensfähig sind (Berthet C et al., 2003; Ortega S et al., 2003; Tetsu O et al., 2003). Zu den genauen Regulatoren des Zellzyklus siehe **Textbox 2**.

Regulatoren des Zellzyklus:

Aufeinanderfolgende Aktivierung von Komplexen aus Zyklinen und Zyklin-abhängigen-Kinasen (Cdks) im Zuge mitogener Signale fördert die Zellzyklusprogression: In der G1-Phase sind die Komplexe ZyklinD/Cdk4 bzw. ZyklinD/Cdk6 aktiv, beim Übergang in die S-Phase ZyklinE/Cdk2, während der S-Phase ZyklinA/Cdk2, und die Komplexe ZyklinA/Cdk1 bzw. ZyklinB/Cdk1 während der G2/M-Phase.

Ein zentraler negativer Regulator des Zellzyklus ist die Retinoblastom-Protein-Familie (Rb), welche den Übergang von der G0/G1-Phase in die S-Phase kontrolliert. In hypophosphorylierter Form bildet Rb mit Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie transkriptionelle Repressorkomplexe an Genen, die für die S-Phase benötigt werden. Inhibiert wird Rb, indem es durch aktive Komplexe aus ZyklinD/Cdk4 bzw. ZyklinD/Cdk6 und im Zuge der Aktivierung durch ZyklinE/Cdk2 hyperphosphoryliert wird. Dies führt zu einer E2F regulierten Genexpression sowie zu Zellproliferation (Sun A et al., 2007).

Weitere negative Regulatoren der Zellzyklusprogression sind die Zyklin-abhängigen-Kinase-Inhibitoren (CKIs). Diese binden und inhibieren die Aktivität der Zyklin/Cdk-Komplexe und hemmen dadurch die Zellzyklusprogression. Sie spielen eine wichtige Rolle in der Regulation der Proliferation während der normalen Entwicklung und Differenzierung sowie nach genotoxischem Stress. In Säugern wird zwischen zwei Familien von CKIs unterschieden: der INK4-Familie, welche die G1-Phase kontrolliert, und der KIP-Familie, die den Übergang von der G1-Phase in die S-Phase kontrolliert. Zur INK4-Familie zählen die Proteine p16 (INK4a), p15 (INK4b), p18 (INK4c) und p19 (INK4d). Zur KIP-Familie gehört neben p27(KIP1) und p57 (KIP2) auch p21 (CIP1, CDK-interagierendes Protein 1). Während die CKIs der INK4-Familie spezifisch die Kinasen Cdk4 und Cdk6 binden und hemmen, kann die KIP-Familie an alle Zyklin-Cdk-Komplexe binden (Sherr CJ und Roberts JM, 1999).

Textbox 2: Regulatoren des Zellzyklus

2.3.1 Antiproliferative Funktion von p21Cip1

Neben der Induktion des G1-Arrestes konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von p21Cip1 auch zu einem Wachstumsarrest in der S- und G2-Phase führt (El-Deiry WS et al., 1994; Niculescu AB 3rd et al, 1998; Brugarolas J et al, 1999). So blockiert p21Cip1 direkt die DNA-Replikation durch Bindung an PCNA, dem Prozessivitätsfaktor der DNA Polymerase *delta*. Mitogene Signale können diesen antiproliferativen Effekten von p21Cip1 durch Induktion von ZyklinD entgegenwirken. ZyklinD in Verbindung mit Cdk4 sequestriert p21Cip1 und verhindert somit, dass p21Cip1 an den ZyklinE/Cdk2-Komplex binden und damit inhibieren kann. Einige Daten weisen sogar darauf hin, dass die Kip-Proteine die Zusammensetzung der ZyklinD-Cdk-Komplexe fördern und damit selbst eine pro-mitogene Funktion ausüben (Cheng M et al., 1999; LaBaer J et al., 1997; Parry D et al., 1999). Unklar ist jedoch, ob diese Komplexe eine katalytische Aktivität aufweisen oder lediglich als “Puffersystem” dienen, das die Verfügbarkeit von Kip-Proteinen kontrolliert, welche die Cdk2-Aktivität regulieren (Olashaw N et al., 2004; Sherr CJ und Roberts JM, 1999).

2.3.2 Anti-apoptotische Funktion von p21Cip1

p21Cip1 kann auf verschiedene Weise die Induktion der Apoptose hemmen:

Die Überexpression von p21Cip1 schützt Zellen vor Anoikis, einer Form der Apoptose, die eingeleitet wird, wenn sich epitheliale Zellen von der extrazellulären Matrix lösen. Die abgelösten Zellen arretieren im Übergang von der G1- in die S-Phase. Dies führt dazu, dass die anti-apoptotische Mitogen-aktivierte-Proteinkinase 1 (MAPK1) phosphoryliert und somit aktiv bleibt und die Genexpression des für die Anoikis wichtigen pro-apoptotischen BH3-only-Proteins Bim hemmt (Collins NL et al., 2005). Auch die zelluläre Lokalisation scheint bei der anti-apoptotischen Funktion von p21Cip1 eine Rolle zu spielen: p21Cip1 formt bei der Translokation vom Nukleus ins Zytoplasma mit dem pro-apoptotischen Protein Ask1 Komplexe und schützt auf diese Weise durch Inaktivierung von Ask1 die Zellen vor Apoptose (Asada M et al., 1999). Ebenso interagiert zytoplasmatisches p21Cip1 mit pro-apoptotischen Proteinen wie Procaspase 3 und hemmt hierdurch dessen Spaltung zur aktiven Caspase 3 (Suzuki A et al., 1998). Bei Brustkrebspatienten konnte sogar gezeigt werden, dass die zytoplasmatische Lokalisation von p21Cip1 mit einer schlechten Prognose einhergeht (Winters ZE et al., 2001; Winters ZE et al., 2003). Als Ursache werden der Verlust der Cdk-inhibitorischen Funktion und der Gewinn der anti-apoptotischen Funktion von zytoplasmatischem p21Cip1 vermutet (Asada M et al., 1999; Huang S et al., 2003). Auch konnte gezeigt werden, dass das Onkogen Akt die subzelluläre Lokalisation von p21Cip1 beeinflusst. Die Akt-vermittelte Phosphorylierung von p21Cip1 an Threonin (Thr)-134 induziert dessen zytoplasmatische Lokalisation (Zhou BP et al., 2001). Zudem wird vermutet, dass die Hemmung der Cdk2-Aktivität durch p21Cip1 indirekt Apoptose unterdrückt. Ein Entzug von Wachstumsfaktoren in Endothelzellen induziert Apoptose, die mit einem Anstieg der Cdk2-Aktivität assoziiert ist. Dies wird erreicht, indem CPP32- und CPP32-like-Caspasen den C-Terminus und damit die nukleäre Lokalisierungssequenz von p21Cip1 (und p27Kip1) abspalten, woraufhin die Proteine den Zellkern verlassen und somit die nukleäre Zyklin-Cdk2-Aktivität nicht mehr hemmen können (Levkau B et al., 1998).

2.3.3 Expression und Funktion von p21Cip1 in Geweben

In den meisten terminal differenzierten Geweben der Maus wie der Skelettmuskulatur, dem Knorpel, der Haut und dem Nasenepithel wird p21Cip1 unabhängig von p53

exprimiert (Parker SB et al., 1995). Am stärksten wird p21Cip1 in Zellen mit hoher Proliferationsrate wie z.B. Hautzellen und Zellen der Magenschleimhaut exprimiert (Macleod KF et al., 1995). Das Protein ist beispielsweise für die Regulation der Proliferation von Hepatozyten wichtig. So konnte gezeigt werden, dass Hepatozyten in *p21cip1*-defizienten Mäusen durch den Wegfall seiner Funktion in der G1-Phase die S-Phase schneller während der Leberregeneration erreichen als Kontrollmäuse (Albrecht JH et al., 1998; Wu H et al., 1996; Luedde T et al., 2003). Mit p19Ink4d kollaboriert p21Cip1, um Zellen für den Gehörsinn in einem postmitotischen Stadium zu halten, was diesen Zellen ein lebenslanges Überleben sichert (Laine H et al., 2007). Während der Entwicklung des Rückenmarks reguliert p21Cip1 neben p27Kip1 und p57Kip2 den zeitlichen Ablauf des Zellzyklusaustrittes, nicht aber die Differenzierung der Neuronen (Gui H et al., 2007). Auch die Stammzellfunktion von p21Cip1 wurde wiederholt belegt. Beispielsweise kontrolliert p21Cip1 das Selbst-Erneuerungspotenzial der Keratinozyten-Stammzellpopulation (Topley GI et al., 1999). Ebenso kontrolliert p21Cip1 die Aufrechterhaltung der hematopoietischen Stammzellpopulation, indem es die Quieszenz bzw. den Eintritt in den Zellzyklus reguliert (Cheng T et al., 2000). Die Proliferation der adulten Stammzellpopulation des Vorderhirns wird ebenfalls von p21Cip1 kontrolliert (Kippin TE et al., 2005).

2.3.4 Regulatoren der *P21CIP1*-Transaktivierung

Die Transaktivierung von *P21CIP1* nach DNA-Schaden wird primär durch p53 reguliert (El-Deiry WS et al., 1993; Gartel AL und Radhakrishnan SK, 2005). Aber auch der Transkriptionsfaktor Miz1 (**s. Einleitung 2.4**) kann nach einem DNA-Schaden, der durch UV-Strahlung oder einem Chemotherapeutikum induziert wurde, an den Kernpromotor von *P21CIP1* binden und die Genexpression aktivieren (Herold S et al., 2002; Wanzel M et al., 2005). Weitere Transkriptionsfaktoren, die die Transaktivierung von *P21CIP1* regulieren, sind unter anderem Sp1/Sp3 und Myc (Gartel AL und Tyner AL, 1999). Myc ist ein Beispiel für einen transkriptionellen Repressor der *P21CIP1*-Expression. Zum einen wird Myc über Miz1 an den *P21CIP1*-Promotor rekrutiert und hemmt neben der Miz1 vermittelten Transaktivierung auch die p53 vermittelte Transaktivierung von *P21CIP1* (Herold S et al., 2002; Seoane J et al., 2002). Zum anderen reprimiert Myc die Sp1 vermittelte Transaktivierung von *P21CIP1*, indem es direkt mit Sp1 oder einem Komplex bestehend aus Sp1 und Smad interagiert (Gartel AL und Shchors K, 2003).

2.4 Miz1

Wie beschrieben ist Miz1 ein weiterer Transkriptionsfaktor, der die Expression von *P21CIP1* reguliert. Miz1 wurde als Myc-interagierendes-Zinkfinger-Protein 1 in einem Hefe-2-Hybrid-Assay entdeckt (Peukert K et al., 1997) und gehört aufgrund seiner Struktur und seiner Sequenzhomologie zur Gruppe der Zinkfinger-Transkriptionsfaktoren mit einer POZ-(Poxvirus und Zinkfinger)-Domäne (s. **Einleitung 2.6**).

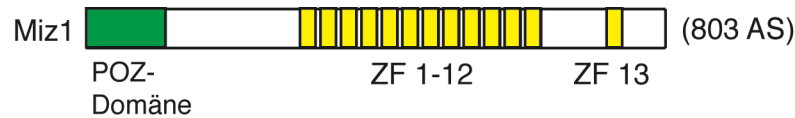


Abb. 2: Struktur des Miz1-Proteins

(ZF: Zinkfinger; AS: Aminosäuren)

Das Protein Miz1 besitzt im N-terminalen Bereich eine konservierte POZ-Domäne sowie dreizehn Zinkfinger motive des Cys2-His2-Typs, von denen zwölf unmittelbar aufeinanderfolgend in Tandem-Wiederholungen liegen (**Abbildung 2**). Der dreizehnte Zinkfinger ist durch eine Region von 80 Aminosäuren C-terminal von den restlichen Zinkfingern isoliert. Über diese so genannte Spacer-Region interagiert Miz1 mit Myc durch Ausbildung einer α -helikalen Struktur (Peukert K et al., 1997).

2.4.1 Funktionen von Miz1

Miz1 ist für die embryonale Entwicklung während der Gastrulation in Mäusen wichtig. Miz1-defiziente Embryonen der Maus sind nicht lebensfähig. Sie zeigen eine stark verzögerte frühe embryonale Entwicklung und durchlaufen keine normale Gastrulation (Adhikary S et al., 2003). Andere Studien zeigen, dass Miz1 eine Rolle in der Wnt regulierten zellulären Differenzierung von epithelialen Kolonzellen spielt (van de Wetering M et al., 2002) sowie die Adhäsion und Differenzierung in Keratinozyten reguliert. Hierbei interferiert Miz1 mit dem TGF β -Signalweg (Gebhardt A et al., 2006). Außerdem übt Miz1 eine wichtige Funktion während der zellulären Antwort nach Schädigung der DNA durch UV-Bestrahlung bzw. durch Chemotherapeutika wie Adriamycin aus (Herold S et al., 2002; Wanzel M et al., 2005).

2.4.2 Zielgene von Miz1

Miz1 übt die genannten Funktionen über die Induktion seiner positiv regulierten Zielgene aus, zu denen unter anderem *P21CIP1* (Herold S et al., 2002; Seoane J et al.,

2002, Wu S et al., 2003), *P57KIP2* (Adhikary A et al., 2003), *P15INK4B* (Seoane J et al., 2001; Staller P et al., 2001) und Integrine (Gebhardt A et al., 2006) zählen. So exprimieren Miz1-defiziente Maus-Embryonen kein *p57kip2* (Adhikary A et al., 2003), ist Miz1 durch Transaktivierung der *p15Ink4b*-Expression ein Mediator des TGF β vermittelten Zellzyklusarrestes in Keratinozyten (Seoane J et al., 2001) und vermittelt die Differenzierung von epithelialen Kolonzellen sowie die DNA-Schadensantwort unter anderem durch Transaktivierung von *p21cip1* (van de Wetering M et al., 2002; Herold S et al., 2002). Die Zelladhäsion in der Epidermis reguliert Miz1 über die Transaktivierung von Integrinen (Gebhardt A et al., 2006). Für die DNA-Schadensantwort wurde gezeigt, dass Miz1 zudem Zielgene reprimieren kann, wie den Promotor der Pyruvat-Dehydrogenase-Phosphatase (PDP) und seiner regulatorischen Untereinheit PDR (Wanzel M et al., 2005).

2.4.3 Regulation der transkriptionellen Aktivität von Miz1

Die transkriptionelle Aktivität von Miz1 wird durch eine Reihe von Proteinen reguliert, die direkt mit Miz1 interagieren. Für den *P15INK4B*-Promotor wurde gezeigt, dass Miz1 zur Transaktivierung mit dem Co-Aktivator p300 interagiert (Staller P et al., 2001). Von Miz1 transaktivierte Zielgene wie *P21CIP1*, *P57KIP2*, *P15INK4B* sind zugleich reprimierte Zielgene des Transkriptionsfaktors und Onkoproteins Myc (Staller P et al., 2001, Dauphinot L et al., 2001). Eine Mutante von Myc, MycV396D, kann nicht mehr mit Miz1 interagieren und damit auch nicht mehr die Transaktivierung der Genexpression von *P21CIP1* hemmen (Herold S et al., 2002). Zu weiteren Proteinen, die durch Interaktion mit Miz1 die Transaktivierung von *P21CIP1* blockieren, zählen HCF-1 (Piluso D et al., 2002), wie Myc ein Regulator der Zellzyklusprogression (Goto H et al., 1997), und Bcl-6, ein Mediator der Bildung des germinalen Zentrums in B-Zellen (Phan RT et al., 2005) und wie Miz1 ein Zinkfinger-Transkriptionsfaktor mit POZ-Domäne. Beide Proteine interagieren dabei mit Miz1 direkt am Promotor. HCF-1 hemmt wie Myc die Rekrutierung von p300, Bcl-6 rekrutiert möglicherweise die Histondeacetylase HDAC2. Daneben kann die Miz1 vermittelte Transaktivierung der Genexpression von *P21CIP1* auch durch TopBP1 gehemmt werden, ein Protein, das unter anderem in der zellulären Antwort nach UV induziertem DNA-Schaden involviert ist (Mäkinen M et al., 2001; Yamane K et al., 2002). 14-3-3 β ist ein weiteres Protein, das die Miz1 vermittelte Transaktivierung von *P21CIP1* hemmen kann. Die Hauptfunktion von 14-3-3 β scheint allerdings in der De-Repres-

sion von Miz1 reprimierten Zielgenen nach DNA-Schaden zu liegen, deren Expression nicht durch Myc reguliert wird. Wichtig für die Interaktion mit 14-3-3eta ist hierbei die vorherige Phosphorylierung von Miz1 durch Akt. Durch die Interaktion mit 14-3-3eta wird die Bindung von Miz1 an seine reprimierten Zielgene inhibiert (Wanzel M et al., 2005). Mit welchen Proteinen Miz1 für die Repression dieser Gene agiert, ist jedoch unklar.

2.5 Histondeacetylasen

Neben Transkriptionsfaktoren können weitere Proteingruppen wie Histondeacetylasen (HDACs) die Genexpression von *P21CIP1* beeinflussen. Beispielsweise sind p53 und HDAC1 antagonistische Regulatoren der *P21CIP1*-Expression (Lagger G et al., 2003). HDAC1-defiziente Mäuse sind embryonal lethal. Dies wird auf einen Wachstumsarrest zurückgeführt, der durch die vermehrte Transaktivierung von *p21CIP1* und *p27KIP1* verursacht wird (Lagger G et al., 2002). Histondeacetylasen sind die Gegenspieler der Histonacetyltransferasen (HATs) und werden von transkriptionellen Repressoren rekrutiert. Durch Deacetylierung von Histonen tragen HDACs zu einer geschlossenen Chromatinstruktur und transkriptionellen Repression bei (Ocker M und Schneider-Stock R, 2007). Daneben können HDACs auch Nicht-Histon-Proteine wie beispielsweise den Transkriptionsfaktor p53 deacetylieren. Dies führt zu einer Reduktion seiner Bindefähigkeit an die DNA und erniedrigt damit seine transkriptionelle Aktivität (Gu W und Roeder RG, 1997; Juan LJ et al., 2000).

2.5.1 Einteilung der HDACs

HDACs werden in vier Klassen eingeteilt, basierend auf Sequenzhomologien zu ihrem Gegenpart in Hefe. Zur Klasse I zählen HDAC1-3 und HDAC8. Sie sind verwandt mit der Hefe Histondeacetylase RPD3. Die Klasse II besteht aus HDAC4-7, 9 sowie 10 und ist verwandt mit der Hefe Histondeacetylase HDA1. Die Klasse III besteht aus Sirt1-7 und ist mit dem Hefe Sir2 verwandt. Die Klasse III ist strukturell nicht mit den anderen Klassen verwandt sowie unempfindlich gegenüber den bisher bekannten HDAC-Inhibitoren. Das einzige Mitglied der Klasse IV ist HDAC11. Klasse I und IV HDACs sind rein nukleäre Proteine, wohingegen Klasse II HDACs im Nukleus und Zytoplasma durch ihre reversible Interaktion mit dem 14-3-3-Protein lokalisiert sein können (Wade PA, 2001).

Für die HDACs der Klasse I wurde eine Anzahl HDAC-assoziiierter-Faktoren und Komplexe, die HDACs enthalten, identifiziert. Beispielsweise bilden HDAC1 und HDAC2 mit dem Repressorprotein mSin3 einen Komplex. Dieser ist von der Hefe bis zum Menschen hoch konserviert und besteht in Säugern aus acht Komponenten: mSin3, HDAC1, HDAC2, RbAp46, RbAp48, SAP30, SAP18 und Sds3. Durch Interaktion mit mSin3 können weitere Enzyme wie Chromatin-Remodeling-Enzyme, Histon-Methyltransferasen und DNA-Methyltransferasen zu dem Komplex hinzutreten, wodurch dieser spezialisierte Funktionen ausüben kann (Silverstein RA und Ekwall K, 2005). Des Weiteren wurden HDAC1 und HDAC2 auch in den Multi-Proteinkomplexen NuRD-Mi2 und coREST nachgewiesen (Knoepfler PS und Eisenman RN, 1999; You A et al., 2001). Für HDAC6 wurde zum einen gezeigt, dass es mit Mikrotubulin assoziiert ist und α -Tubulin deacetyliert, wodurch es vermutlich Mikrotubuli-abhängige Zellmotilität vermittelt (Hubbert C et al., 2002). Zum anderen wurde gezeigt, dass HDAC6 über die Deacetylierung von Cortactin die Aktin-abhängige Zellmotilität beeinflusst (Zhang X et al., 2007). Zudem wurde HDAC6 als multivalenter Adaptor identifiziert, der gleichzeitig Dynein/Dynaktin der Mikrotubuli und Multiubiquitinketten falsch gefalteter Proteine binden kann und somit zur Aggresomen-Bildung beiträgt (Seigneurin-Berny D et al., 2001; Kawaguchi Y et al., 2003). Aggresomen sind Organellen, die für die effiziente Beseitigung von falsch gefalteten zytoplasmatischen Proteinen benötigt werden. Auch deacetyliert HDAC6 das zytoplasmatische Chaperon-Protein HSP90. Die Deacetylierung ist wichtig für dessen Funktion, denn Hyperacetylierung von HSP90 in HDAC6-defizienten Zellen führt zum Verlust der Chaperon-Aktivität (Kovacs JJ et al., 2005).

2.5.2 HDAC-Aktivität in Krebszellen

HDACs sind in vielen Krebsarten dereguliert: Zum einen werden HDACs überexprimiert, wie beispielsweise HDAC2 bei kolorektalem, zervikalem oder Magen-Krebs. Zum anderen werden HDACs von Onkogenen rekrutiert, um Tumorsuppressor-Gene zu inhibieren. So rekrutiert z.B. das Onkogen PLZF-RAR α in Leukämiezellen HDACs, um die Transaktivierung von *P21CIP1* zu inhibieren (Ocker M und Schneider-Stock R, 2007).

2.5.3 HDAC-Inhibitoren

Der Einsatz von HDAC-Inhibitoren ist ein neuer medizinischer Ansatz in der Krebstherapie. HDAC-Inhibitoren wie SAHA und Trichostatin A blockieren die Effekte der HDAC-Klassen I und II. Der genaue Antitumor-Mechanismus der Inhibitoren ist derzeit unbekannt. Denn obwohl eine Interaktion zwischen HDACs und dem Chromatin an vielen Stellen im Genom nachgewiesen wurde, führt die Hemmung der HDAC-Aktivität durch SAHA oder Trichostatin A in unterschiedlichen transformierten Zelllinien nur zu einer Veränderung der Transkription von ca. 2-10 Prozent der exprimierten Gene, darunter auch *P21CIP1*. Diese durch HDAC-Inhibitoren vermittelte Transaktivierung von *P21CIP1* ist unabhängig von dem Transkriptionsfaktor p53. Weitere Effekte von HDAC-Inhibitoren sind die Induktion von Zelltod und Seneszenz sowie die Hemmung der Angiogenese (Ocker M und Schneider-Stock R, 2007). Erste Studien zeigen, dass HDAC-Inhibitoren auch Neuroblastomzelllinien zur Induktion des Zelltodes sensitivieren können (Furchert SE et al., 2007; Mühlethaler-Mottet A et al., 2006).

2.6 BTB/POZ-Proteine

Proteine, die mit Histondeacetylasen interagieren, sind beispielsweise BTB/POZ-Proteine. Der Name BTB bezieht sich auf die abgegrenzte N-terminale BTB-Domäne, die zuerst in den Drosophila-Proteinen Broad-Komplex, Tramtrack und Bric à brac identifiziert wurde (Albagli O et al., 1995). Diese Proteine werden auch als Poxvirus und Zinkfinger (POZ)-Proteine beschrieben. Die BTB/POZ-Domäne ist eine hoch konservierte Domäne von ca. 100 Aminosäuren. Sie wurde bisher in mehr als 200 humanen Proteinen gefunden (van Roy FM und McCrea PD, 2005; Stogios PJ et al 2005). Die Proteine tragen C-terminal meist weitere funktionale Domänen wie *Kelch repeats* oder Zinkfinger.

Das humane Genom kodiert für ca. 60 POZ-Proteine mit Zinkfingern (POZ-ZF) (van Roy FM und McCrea PD, 2005). Viele von ihnen spielen eine wichtige Rolle während der embryonalen Entwicklung sowie der Krebsentstehung (Kelly KF und Daniel JM, 2006). Zu den humanen POZ-ZF-Proteinen zählen u.a. PLZF, Bcl-6, ZBTB7, HIC-1, Kaiso und Miz1. Humane POZ-Proteine mit Zinkfingern kommen häufig in Multiprotein-Transkriptions-Repressorkomplexen und gelegentlich in Transkriptions-Aktivierungskomplexen vor. Sie interagieren mit der DNA über ihre Zinkfingermo-

tive, von denen die Mehrheit dem Krüppel-like-Cys2-His2-Typ entspricht, um Chromatinmodifikationen, Restrukturierung sowie lokale transkriptionelle Aktivierung oder Repression zu verursachen. Hierbei können POZ-ZF-Proteine die transkriptionelle Repression durch HDAC abhängige (Bcl-6, PLZF, Kaiso) oder HDAC unabhängige (HIC-1) Mechanismen auslösen (Kelly KF und Daniel JM, 2006). Dass die POZ-Domäne Protein-Protein-Interaktionen vermittelt, wurde unter anderem am Beispiel der Interaktion zwischen Miz1 und Bcl-6 gezeigt (Phan RT et al., 2005).

2.7 Kaiso Like 1 (Zbtb4)

Kaiso Like 1 (KL1) ist ein von der Arbeitsgruppe Martin Eilers neu entdecktes Protein, das zur Familie der BTB/POZ-Domänen-Zinkfinger-Proteine zählt. Aufgrund seiner Homologien zu Kaiso, wurde Kaiso Like 1 nach diesem benannt, wegen seiner Gruppenzugehörigkeit zu den BTB-Proteinen wird es auch Zbtb4 genannt.

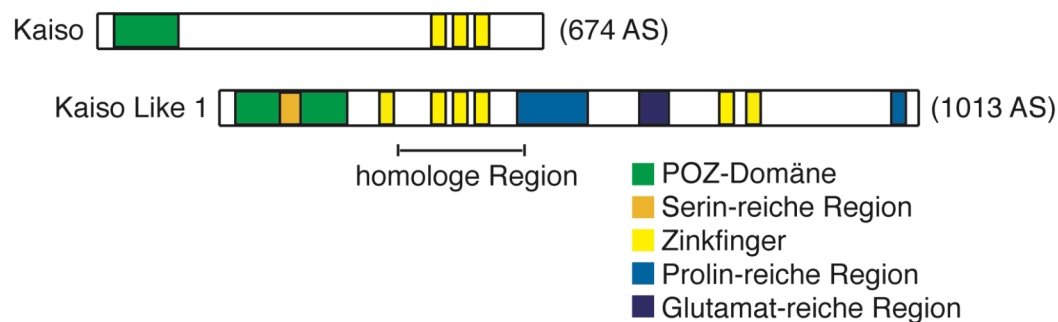


Abb. 3: Struktur der Proteine Kaiso und Kaiso Like 1

KL1 besteht wie Kaiso aus einer N-terminalen POZ-Domäne und mehreren Zinkfingern (**Abbildung 3**). Im KL1-Protein wird die POZ-Domäne durch eine Serin-reiche Region unterbrochen. Zwischen den Zinkfingern 4 und 5 der insgesamt 6 Zinkfinger von KL1 befindet sich eine Prolin-reiche und eine Glutamat-reiche Region, C-terminal eine zweite Prolin-reiche Region. Die Homologie zwischen der POZ-Domäne von Kaiso und KL1 beträgt 32 Prozent, zwischen den drei Zinkfingern von Kaiso und den Zinkfingern 2 bis 4 von KL1 76 Prozent.

2.7.1 Expression von Kaiso Like 1 (KL1) im Neuroblastom

2002 wurde das Genexpressionsprofil von 95 Neuroblastomgewebeproben unterschiedlicher Stadien in einem Microarray untersucht (Berwanger B et al., 2002). Hierbei wurde u.a. gefunden, dass das Genexpressionsprofil für jedes Tumorstadium

spezifisch ist. Von einem dieser Gene, die Tumorstadien spezifisch exprimiert werden, später *KLI* genannt, war nur die EST-Sequenz als KIA-Klon KIAA1538 bekannt. Die mRNA von *KLI* war in schlecht prognostischen Tumoren im Vergleich zu gut prognostischen herunterreguliert. Das *KLI*-Expressionsprofil der 95 untersuchten Neuroblastomgewebeproben ist als relative Expression in **Abbildung 4A** dargestellt. Die Herunterregulation der *KLI*-mRNA im Stadium 4 (metastasierend) *versus* Stadium 1, 2, 3 (lokal begrenzt) ist statistisch signifikant ($p=0,003$). Als Referenz diente die *KLI*-mRNA-Expression der Neuroblastomzelllinie SH-EP. Dieses Ergebnis wurde von Dr. Axel Weber anhand einer unabhängigen Gruppe humaner Neuroblastomproben ($n=98$) – bestehend aus den Stadien 1 ($n=18$), 2 ($n=18$), 3 ($n=17$), 4 ($n=30$) und 4S ($n=15$) – mittels quantitativer Echtzeit-PCR-Analyse validiert und ist als Δ Ct-Wert in **Abbildung 4B** dargestellt. Als Referenz diente das ubiquitär exprimierte Gen $\beta 2$ -MIKROGLOBULIN. Die Herunterregulation der Expression von *KLI* im Stadium 4 *versus* den Stadien 1, 2, 3 ist mit einem p-Wert von $p<0,02$, und im Vergleich Stadium 4 *versus* den Stadien 1, 2, 3, 4S mit einem p-Wert von $p<0,01$ statistisch signifikant. Die Validierung bestätigt das Ergebnis der Microarray-Analyse, dass die mRNA-Expression von *KLI* im schlecht prognostischen Neuroblastomstadium 4 gegenüber den Neuroblastomstadien 1, 2, 3 und 4S statistisch signifikant herunterreguliert ist.

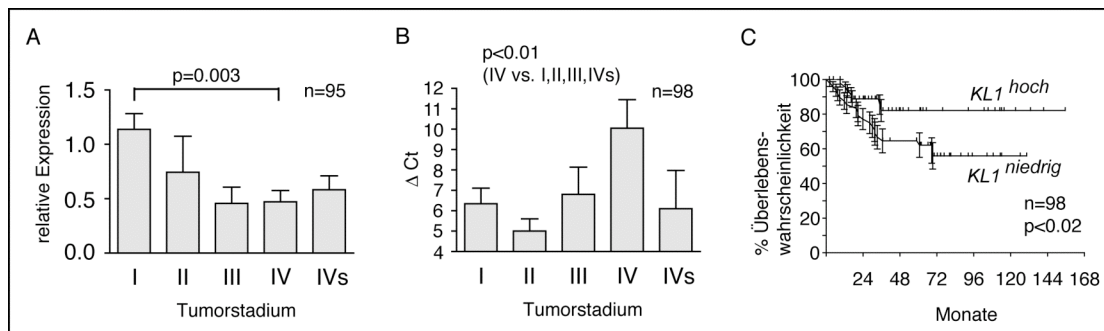


Abb. 4: Die mRNA-Expression von *KLI* ist im Neuroblastomstadium IV herunterreguliert und geht mit einer schlechten Prognose einher

A: Relative *KLI*-mRNA-Expression einer Microarray-Analyse mit 95 Neuroblastomproben. Als Referenz diente die *KLI*-Expression der Neuroblastomzelllinie SH-EP. B: Validierung des *KLI*-Expressionsprofils (dargestellt als Δ Ct-Wert) in 98 weiteren Neuroblastomproben mittels einer Echtzeit-PCR-Analyse. Als Referenz diente die Expression von $\beta 2$ -MIKROGLOBULIN. C: Kaplan-Meier-Überlebensrate der Tumormproben aus B analysiert nach über- und unterdurchschnittlicher *KLI*-mRNA-Expression.

Unterstützt werden diese Daten durch eine Kaplan-Meier-Überlebensanalyse der 98 Neuroblastompatienten über einen Zeitraum von 168 Monaten (**Abbildung 4C**). Eine unterdurchschnittliche *KLI*-Expression geht im Vergleich zu einer überdurchschnitt-

lichen *KL1*-Expression mit einer signifikant schlechteren Überlebensrate einher ($p < 0,02$).

2.7.2 *KL1*-Expression in soliden Tumoren

Eine Analyse der Oncomine-Datenbank (www.oncomine.org) (Rhodes DR et al., 2004) ergab, dass die mRNA-Expression von *KL1* nicht nur im Neuroblastom, sondern auch in einer Vielzahl humaner solider Tumoren im Vergleich zum Normalgewebe herunterreguliert ist. Die **Abbildung 5A** zeigt dies exemplarisch für das Glioblastom und Prostatakarzinom. Zudem wird die *KL1*-Expression Stadien spezifisch im Glioblastom sowie in den Karzinomen der Brust, der Prostata und des Ovars reguliert, d.h. die mRNA-Expression von *KL1* wird im fortgeschrittensten Stadium am stärksten herunterreguliert, ähnlich wie im Neuroblastom. Als Beispiele hierfür werden das Mammakarzinom und Prostatakarzinom gezeigt (**Abbildung 5B**).

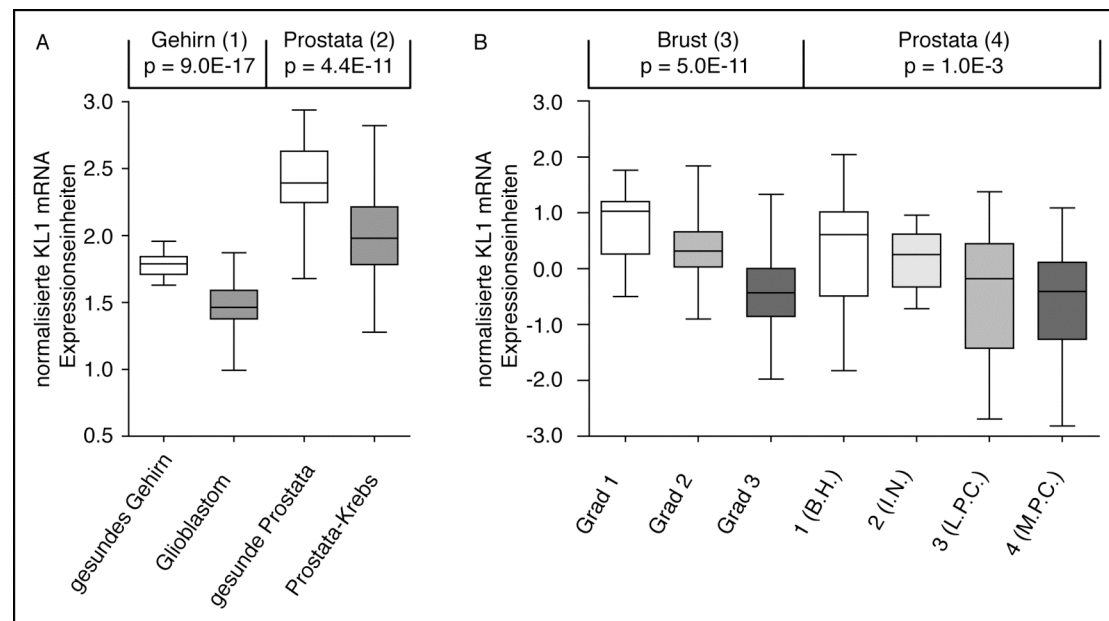


Abb. 5: *KL1*-Expression in soliden Tumoren

Die mRNA-Expression von *KL1* ist im Normalgewebe im Vergleich zum Tumorgewebe (A) und in gut prognostischen Stadien im Vergleich zu schlecht prognostischen (B) herunterreguliert. Die Daten sind in Form einer Box und Whisker Grafik abgebildet mit Fehlerbalken, welche die 5.te und 95.te Perzentile repräsentieren (B.H. = benigne Hyperplasie; I.N. = intraepitheliale Hyperplasie; L.P.C. = lokales Prostatakarzinom; M.P.C. = metastasiertes Prostatakarzinom). (1: Sun L et al., 2006; 2: Lapointe J et al., 2004; 3: van't Veer LJ et al., 2002; 4: Tomlins SA et al., 2007)

2.7.3 *KL1*-Expression im Gewebe und in Zelllinien

Das mRNA-Expressionsprofil von *KL1* in unterschiedlichen humanen Geweben und Zelllinien wurde mittels quantitativer Echtzeit-PCR-Analyse in Duplikaten von Dr. Axel Weber untersucht. Der Mittelwert der relativen Expression von *KL1* aller untersuchten Proben wurde bestimmt und die *KL1*-mRNA-Expression der einzelnen Pro-

ben als ein Vielfaches dieses Mittelwertes dargestellt. Als Referenzgen diente $\beta 2$ -*MIKROGLOBULIN*. **Abbildung 6** zeigt, dass *KL1* vor allem im Gehirn und in den Neuroblastomzelllinien SH-SY5Y und IMR-32 überdurchschnittlich stark exprimiert wird.

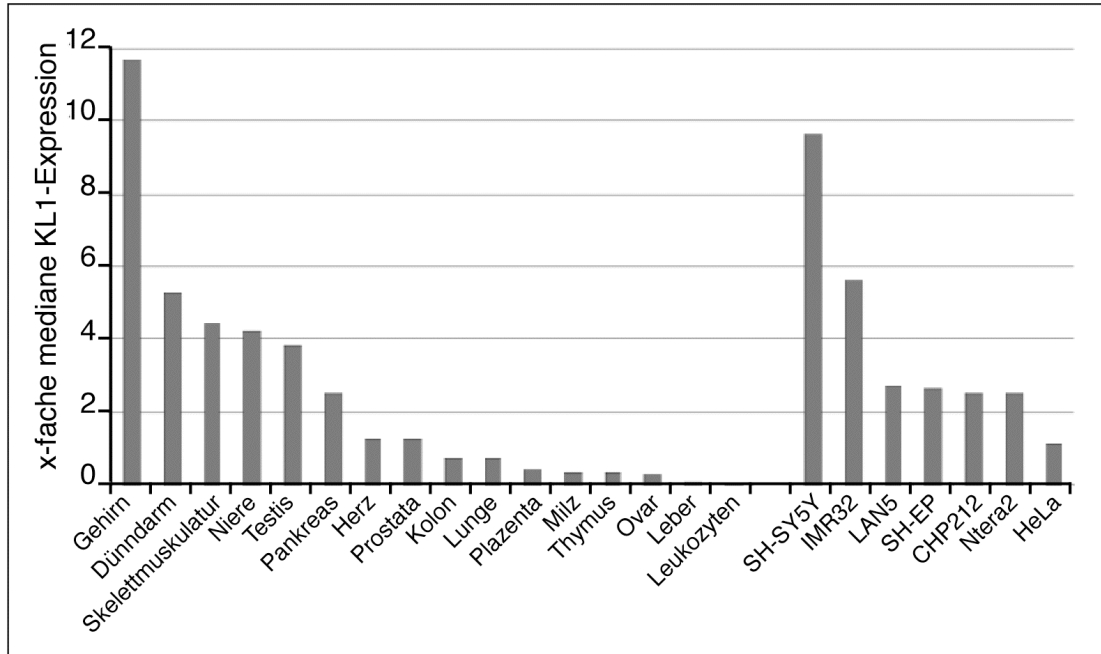


Abb. 6: *KL1*-mRNA wird insbesondere im Gehirn und in den Neuroblastomzelllinien SH-SY5Y und IMR32 stark exprimiert

Dargestellt ist die x-fache mediane mRNA-Expression von *KL1* in unterschiedlichen humanen Geweben (links) und Zelllinien (rechts). Als Referenzgen diente $\beta 2$ -*MIKROGLOBULIN*.

3. ERGEBNISSE

3.1 Herstellung der Konstrukte

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit lag kein KL1-Antikörper vor. Das KL1-Protein wurde daher C-terminal mit einem Haemagglutinin-Anhang (HA) markiert. Hierzu wurde die kodierende Sequenz von *KL1* zunächst via PCR aus foetaler Gehirn-cDNA (Clontech) in den Vektor pCR-XL-Topo kloniert (Dr. Axel Weber, persönliche Kommunikation) und anschließend über die Restriktionsenzymschnittstellen BamHI und XbaI in die Expressionsvektoren 3HApCMV und GalHApCMV kloniert. Um KL1 in Zelllinien mittels Infektion stabil überexprimieren zu können, wurde KL1 mit dem fusionierten HA-Anhang über die Restriktionsenzymschnittstelle EcoRI in einer „blunt end“-Klonierung aus dem Vektor 3HApCMV-*KL1* in den Vektor pBabe (Puromycin- bzw. Zeocinresistenz) kloniert. Um die Expression von KL1 in dem mit Tetrazyklin bzw. Doxycyclin induzierbaren T-REx-System gezielt anschalten zu können, wurde KL1 mit dem fusionierten HA-Anhang aus dem Vektor 3HApCMV-*KL1* über die Restriktionsenzymschnittstellen BamHI und XbaI in den Vektor pcDNA4/TO (Zeocinresistenz) kloniert. Die Konstrukte wurden durch Sequenzierung auf ihre Korrektheit hin überprüft und verifiziert.

3.2 Analyse der Überexpression von KL1 in verschiedenen Zelllinien

3.2.1 Die Überexpression von KL1 mit anschließender Selektion ist zytotoxisch für Neuroblastomzelllinien

Zur Herstellung von Neuroblastomzelllinien, die das KL1-Protein stabil überexprimieren, wurden IMR-32-, SH-SY5Y- und SH-EP-Zellen mit dem Konstrukt pBabe-puro-3HAKL1 (in Duplikaten) bzw. mit dem leeren Vektor pBabe-puro als Kontrolle infiziert. Anschließend wurden die Zellen mit Puromycin selektioniert. Die mit KL1-Expressionsvektor infizierten Zellen wurden drei bzw. acht Tage, die mit Kontrollvektor infizierten Zellen drei Tage nach Beginn der Selektion fixiert und mit Kristallviolett (KV) angefärbt. Das Ergebnis ist in **Abbildung 1.1A** dargestellt. Während die mit Kontrollvektor infizierten Zellen die Puromycinselektion zu mehr als 90% überlebten, überlebten die meisten der mit KL1-Expressionsvektor infizierten Zellen nicht. Auch acht Tage nach dem Selektionsbeginn wuchsen keine mit KL1-Expressionsvektor infizierten Zellklone der Zelllinien SH-SY5Y und IMR-32. Von den mit KL1-

Expressionsvektor infizierten SH-EP-Zellen wuchsen nach acht Tagen vereinzelt Zellklone. Die Infektion mit dem Konstrukt pBabe-puro-3HAKL1 mit anschließender Puromycinselektion war demnach zytotoxisch für SH-SY5Y- und IMR-32- und den Großteil der SH-EP-Zellen.

Um dieses Ergebnis zu bestätigen, wurden IMR-32-, SH-SY5Y- und SH-EP-Zellen neben den Konstrukten pBabe-puro-3HAKL1 und pBabe-puro mit den Konstrukten pBabe-puro-*FYN* und pBabe-puro-*14-3-3ETA* infiziert. Diese Vektoren mit kodierenden Gensequenzen für *FYN* bzw. *14-3-3ETA* dienten als zusätzliche Infektionskontrollen zum leeren Vektor. Die Infektion mit dem Konstrukt pRetrosuper-GFP, welches keine Puromycinresistenz trägt, diente als Kontrolle für den Abschluss der Selektion. Ein Tag nach Beginn der Puromycinselektion waren alle mit dem Konstrukt pRetrosuper-GFP infizierten IMR-32-Zellen abgestorben, nach zwei Tagen die entsprechenden SH-EP- und SH-SY5Y-Zellen. Alle infizierten IMR-32-Zellen wurden daher einen Tag nach Selektionsbeginn, SH-EP- und SH-SY5Y-Zellen zwei Tage nach Selektionsbeginn fixiert und mit KV angefärbt. Das Ergebnis ist in **Abbildung 1.1B** für IMR-32-Zellen zu sehen. Erneut haben die mit KL1-Expressionsvektor infizierten Zellen die Puromycinselektion im Gegensatz zu den mit leerem Vektor, mit den Expressionsvektoren für *FYN* und *14-3-3ETA* infizierten Zellen nicht überlebt.

Um auszuschließen, dass das Absterben der mit KL1-Expressionsvektor infizierten Zellen darauf zurückzuführen ist, dass die Zellen zytotoxisch auf die Co-Expression von KL1 und der Puromycin-Acetyl-Transferase, welche die Puromycinresistenz vermittelt, reagieren, wurden SH-EP-Zellen mit den Konstrukten pBabe-bleo-3HAKL1 und pBabe-bleo infiziert. Zu Beginn der Zeocinselektion wurden die Zellen in einer Verdünnung von je 1:10, 3:10 und 6:10 ausplattiert und acht Tage später mit KV angefärbt. Das Ergebnis ist in **Abbildung 1.1C** dargestellt. Die Kontrollzellen überlebten die Zeocinselektion zu ca. 90%, wie die Anfärbung der in einer Verdünnung von 1:10 ausplattierten Kontrollzellen zeigt. Hingegen starben mehr als 95% der mit KL1-Expressionsvektor infizierten und mit Zeocin selektionierten SH-EP-Zellen. Dieses Ergebnis zeigt, dass das Absterben der Zellen nach Infektion mit den pBabe-KL1-Expressionskonstrukten und anschließender Selektion unabhängig von dem co-exprimierten Antibiotikaresistenz-Gen ist.

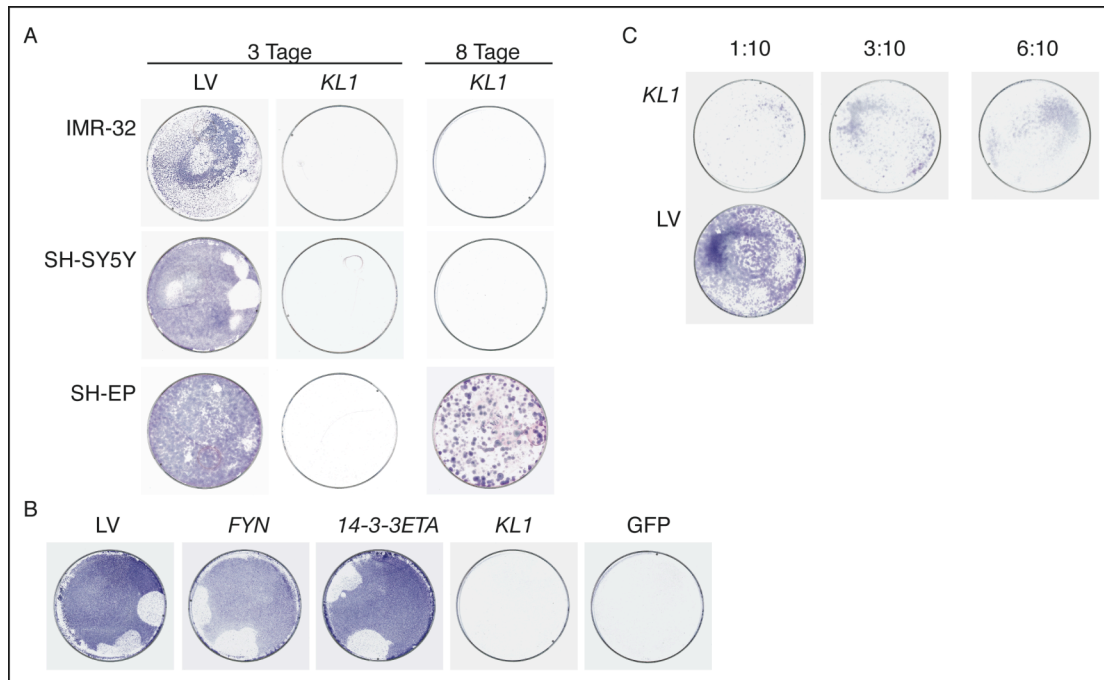


Abb. 1.1: Die Infektion mit KL1-Expressionskonstrukt und anschließende Selektion ist zytotoxisch für Neuroblastomzellen

A: Anfärbung mit Kristallviolett (KV) von IMR-32-, SH-SY5Y- und SH-EP-Zellen drei (KL1, LV) bzw. acht (KL1) Tage nach Beginn der Puromycinselektion. Die Zellen wurden zuvor mit den Konstrukten pBabe-puro-3HAKL1 (KL1) und pBabe-puro (LV) infiziert. B: KV-Anfärbung von IMR-32-Zellen einen Tag nach Beginn der Puromycinselektion. Die Zellen wurden zuvor mit den Konstrukten pBabe-puro, pBabe-puro-*FYN*, pBabe-puro-*14-3-3ETA*, pBabe-puro-3HAKL1 und pRetrosuper-GFP infiziert. C: KV-Anfärbung von SH-EP-Zellen acht Tage nach Beginn der Zeocinselektion. Die Zellen wurden zuvor mit den Konstrukten pBabe-bleo-3HAKL1 und pBabe-bleo infiziert und vor Beginn der Selektion in den Verdünnungen 1:10 (KL1, LV), 3:10 (KL1) und 6:10 (KL1) ausplattiert.

3.2.2 Die Überexpression von KL1 mit anschließender Selektion ist auch für andere Zelllinien zytotoxisch

Als Nächstes wurde die Frage geklärt, ob die durch Infektion des KL1-Expressionskonstrukts mit anschließender Selektion hervorgerufene Zytotoxizität spezifisch für Neuroblastomzelllinien ist oder auch für andere Zelllinien gilt. Hierzu wurden die humane Zervixkarzinomzelllinie HeLa und die humane Kolonadenomzelllinie LS174T untersucht.

Da die verwendeten HeLa-Zellen keinen für die Infektion benötigten ecotropen Rezeptor exprimierten, wurden sie mit den Konstrukten pBabe-puro-3HAKL1 und pBabe-puro transfiziert. Zu Beginn der Puromycinselektion wurden die Zellen in einer Verdünnung von 1:5 (in Duplikaten) ausplattiert. Die restlichen Zellen wurden für eine Proteinanalyse verwendet (s.u.). Drei Tage nach Selektionsbeginn wurden die Zellen fixiert und mit KV angefärbt bzw. für die Proteinanalyse geerntet (**s. Abbil-**

dung 1.3). In **Abbildung 1.2A** ist das Ergebnis der KV-Färbung dargestellt. Die mit Kontrollvektor transfizierten HeLa-Zellen überlebten die Puromycinselektion zu ca. 90%, die mit KL1-Expressionsvektor transfizierten HeLa-Zellen zu ca. 25-30%. Die LS174T-Zellen wurden mit den Konstrukten pBabe-puro-3HAKL1 und pBabe-puro infiziert. Nach zwei Tagen wurden die Zellen mit Puromycin selektioniert und mit KV angefärbt. Das Ergebnis ist in **Abbildung 1.2B** dargestellt. Die Zellen starben zu mehr als 90% nach der Infektion mit KL1-Expressionsvektor. Wie bei den SH-EP-Zellen wuchsen auch hier unter Selektion einige wenige Zellklone (nicht gezeigt). Das Experiment zeigt, dass auch für den Großteil der HeLa- und LS174T-Zellen die Transfektion bzw. Infektion mit KL1-Expressionskonstrukt mit anschließender Selektion zytotoxisch ist.

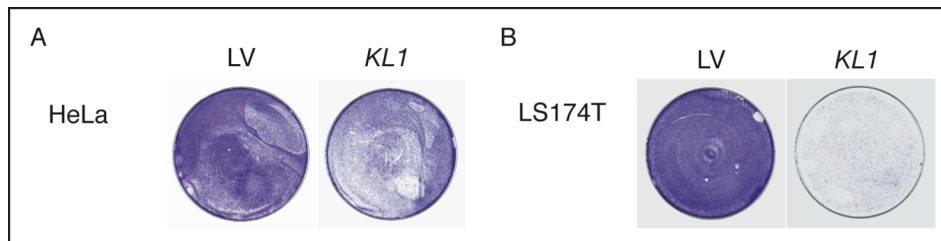


Abb. 1.2: Die Transfektion/Infektion mit KL1-Expressionskonstrukten mit anschließender Selektion ist auch für weitere Zelllinien zytotoxisch

A: KV-Anfärbung von HeLa-Zellen drei Tage nach Beginn der Puromycinselektion. Die Zellen wurden zuvor mit den Konstrukten pBabe-puro-3HAKL1 und pBabe-puro transfiziert und vor Beginn der Selektion in einer Verdünnung von 1:5 ausplattiert. B: KV-Anfärbung von mit Expressionskonstrukt pBabe-puro-3HAKL1 bzw. pBabe-puro infizierten LS174T-Zellen zwei Tage nach Beginn der Puromycinselektion.

3.2.3 Nachweis der KL1-Expression

Die mit KL1-Expressionsvektor transfizierten und mit Puromycin selektionierten HeLa-Zellen wurden im Folgenden auf Expression des HA-markierten KL1 mittels Proteinanalyse getestet. **Abbildung 1.3** zeigt eine Western-Blot-Analyse vor und drei Tage nach dem Selektionsbeginn. Die KL1-Expression wurde indirekt durch die Detektion des an KL1 fusionierten Haemagglutinin (HA)-Anhangs mittels anti-HA-Antikörper nachgewiesen. Der Nachweis von Cdk2 diente als Ladekontrolle. Wie aus der Abbildung zu erkennen ist, wurde das KL1-Protein vor Selektionsbeginn exprimiert. Zellen nach Selektionsabschluss exprimierten (exogenes) KL1 nur sehr schwach.

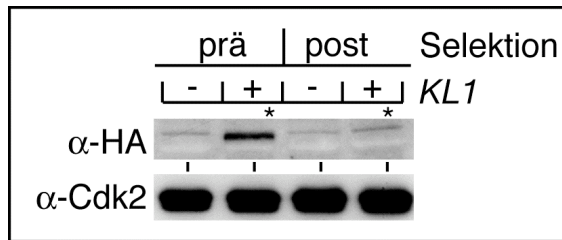


Abb. 1.3: Verlust der KL1-Expression nach Selektion

Der Immunoblot zeigt die mit anti-HA-Antikörper detektierte Expression von KL1(*) in HeLa Zellen vor und drei Tage nach Selektionsbeginn. Die Zellen waren mit dem Expressionskonstrukt pBabe-puro-3HAKL1 transfiziert und anschließend mit Puromycin selektioniert worden. Als Ladekontrolle diente der Nachweis von ubiquitär exprimiertem Cdk2.

Diejenigen SH-EP-Zellklone und LS174T-Zellklone, welche die Infektion mit KL1-Expressionsvektor und Puromycin-Selektion überlebt hatten, wurden jeweils zu einem Zellpool zusammengeführt. Die KL1-Expression wurde auf mRNA- und Proteinebene untersucht. Die RT-PCR-Analyse wurde mit sequenzspezifischen Primern gegen *KL1* durchgeführt. Die Amplifikation von $\beta 2$ -MIKROGLOBULIN diente als Kontrolle für die in der PCR-Reaktion eingesetzte gleiche Ausgangsmenge an cDNA. Zur Überprüfung, ob die isolierte RNA mit genomischer DNA kontaminiert worden war, wurde eine RT-PCR-Analyse ohne Reverse Transkriptase durchgeführt. Das Ergebnis war negativ (nicht gezeigt). Das Ergebnis der RT-PCR-Analyse zeigt **Abbildung 1.4A**. Die mit Primern gegen $\beta 2$ -MIKROGLOBULIN amplifizierten Proben wurden nach 28 Zyklen, die gegen *KL1* amplifizierten Proben nach 34 Zyklen entnommen. Das Gel-foto zeigt eine deutliche Überexpression von *KL1*-mRNA in den mit KL1-Expressionsvektor infizierten SH-EP-Zellen im Vergleich zu den mit leerem Kontrollvektor infizierten Zellen. Die *KL1*-Überexpression in den LS174T-Zellen, die KL1 stabil exprimieren, war im Vergleich zu den SH-EP-Zellen, die KL1 stabil exprimieren, 4fach geringer. Hier war die endogene *KL1*-Expression 2fach stärker als in den SH-EP-Zellen. Das Ergebnis der Western-Blot-Analyse zeigt **Abbildung 1.4B**. Der repräsentative Immunoblot wurde zur Detektion von überexprimiertem KL1 mit einem anti-HA- und mit einem anti-Cdk2-Antikörper zur Detektion von endogenem Cdk2 als Ladekontrolle entwickelt. Die mit KL1-Expressionsvektor stabil infizierten SH-EP-Zellen exprimierten KL1-Protein ca. 8fach stärker als die mit KL1-Expressionsvektor stabil infizierten LS174T-Zellen.



Abb. 1.4: Überexpression von KL1 nach stabiler Infektion

A: Nachweis der endogenen und exogenen mRNA-Expression von *KL1* in SH-EP- und LS174T-Zellen. Die cDNA von SH-EP- und LS174T-Zellen, die mit den Expressionskonstrukten pBabe-puro-3HAKL1 bzw. mit Leervektor infiziert und anschließend selektioniert worden waren, wurde in einer RT-PCR-Analyse mit sequenzspezifischen Primern gegen *KL1* (34 Zyklen) amplifiziert. *β2-MIKROGLOBULIN* (28 Zyklen) diente als Ladekontrolle. B: Der Immunoblot zeigt die exogene KL1-Expression der unter A beschriebenen SH-EP- und LS174T-Zellen, nachgewiesen mit einem anti-HA-Antikörper. Cdk2 diente als Ladekontrolle. Gezeigt werden Immunoblots mit einer kurzen und einer längeren Expositionszeit.

3.2.4 KL1-Überexpression induziert Apoptose

Diejenigen Zellen, welche die Infektion bzw. Transfektion mit dem Konstrukt pBabe-puro-3HAKL1 mit anschließender Selektion überlebt hatten, zeigten nach Abschluss der Selektion keinen Phänotyp hinsichtlich Koloniebildung und Proliferation gegenüber Kontrollzellen (Daten nicht gezeigt). Und auch ein SH-EP-Zellklon (#6), der exogenes KL1 erst nach Zugabe von Doxycyclin über ein T-REx-System exprimiert, zeigte in der Wachstumskurve keinen Unterschied in der Proliferation im Vergleich zur Kontrolle (Daten nicht gezeigt). Der Zellklon zeigte allerdings eine im Vergleich zu mit dem Konstrukt 3HApCMV-*KL1* transfizierten bzw. mit dem Konstrukt pBabe-puro-3HAKL1 infizierten Zellen schwache KL1-Expression (**Abbildung 1.8 rechts**).

Für die meisten unter 3.2.1 und 3.2.2 beschriebenen Zellen war die Transfektion bzw. Infektion mit dem KL1-Konstrukt mit anschließender Selektion jedoch zytotoxisch. Weil von HeLa-Zellen der größte Prozentsatz an Zellen die Transfektion mit dem KL1-Expressionsvektor pBabe-puro-3HAKL1 mit anschließender Selektion überlebte (**s. Abbildung 1.2**), wurden diese nochmals auf Zytotoxizität der Transfektion mit dem KL1-Expressionskonstrukt und anschließender Selektion untersucht. Dazu wurden die Zellen auf ihre Fähigkeit, Kolonien auszubilden, getestet sowie ihr Zellzyklusprofil und der Anteil apoptotischer Zellen untersucht. Im Unterschied zu den vo-

rangegangenen Experimenten fand der Selektionsbeginn mit Puromycin zu einem früheren Zeitpunkt statt.

Für den „colony formation“-Assay wurden exponentiell wachsende HeLa-Zellen mit den Konstrukten pBabe-puro-3HAKL1 bzw. pBabe-puro transfiziert. 30h (zuvor 48h) nach der Transfektion begann die Puromycinselektion. Nach Abschluss der Selektion wurden 1×10^5 Zellen ausplattiert. Die Zellen wurden jeweils am Tag 1, 3, 5 und 6 nach dem Ausplattieren fixiert und mit Kristallviolett angefärbt. Das Ergebnis ist in **Abbildung 1.5** dargestellt. Wie bereits unter 3.2.2 beschrieben, starb der Großteil (ca. 90%) der mit KL1-Expressionskonstrukt transfizierten und mit Puromycin selektionierten HeLa-Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen.

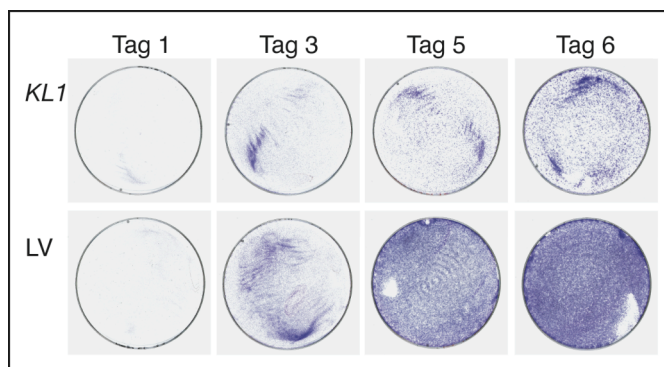


Abb 1.5: Reduzierte Fähigkeit der Koloniebildung nach Transfektion mit KL1-Expressionskonstrukt und abgeschlossener Selektion

KV-Anfärbung von mit dem Expressionskonstrukt pBabe-puro-3HAKL1 bzw. Kontrollkonstrukt (LV) transfizierten und selektionierten HeLa-Zellen. Je 1×10^5 Zellen wurden nach Abschluss der Selektion ausplattiert und nach 1, 3, 5 und 6 Tagen mit KV angefärbt.

Die quantitative Bestimmung der Zellen in den einzelnen Zellzyklusphasen sowie der apoptotischen Zellen erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Kennzeichnend für apoptotische Zellen ist ihre kleinfragmentierte DNA. Sie weisen daher einen subG1-DNA-Gehalt ($< 2n$) in der Durchflusszytometrie auf. HeLa-Zellen wurden mit den Konstrukten pBabe-puro-3HAKL1 bzw. pBabe-puro transfiziert. 30h nach Transfektion begann die Puromycinselektion. Nach Abschluss der Selektion wurden die Zellen in Triplikaten ausplattiert, drei Tage später geerntet und in einer PI-FACS-Analyse untersucht. Das Ergebnis ist in **Abbildung 1.6A** dargestellt. Die Grafik zeigt den prozentualen Anteil der Zellen in den einzelnen Zellzyklusphasen sowie der apoptotischen Zellen in der subG1-Region. Demnach befanden sich doppelt so viele mit KL1-Konstrukt transfizierte HeLa-Zellen in der subG1-Region als Kontrollzellen.

Die **Abbildung 1.6B** zeigt das Ergebnis einer Western-Blot-Analyse der HeLa-Zellen, die mit dem KL1-Expressionsvektor transfiziert und mit Puromycin selektioniert

worden waren. Die Überexpression von KL1-Protein wurde mit einem anti-HA-Antikörper nachgewiesen. Der Nachweis von Cdk2 diente als Ladekontrolle.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Unterdrückung der Koloniebildung (**s. Abbildung 1.5**) nach Transfektion von KL1-Expressionskonstrukt und anschließender Selektion mit einer Induktion der Apoptose korreliert.

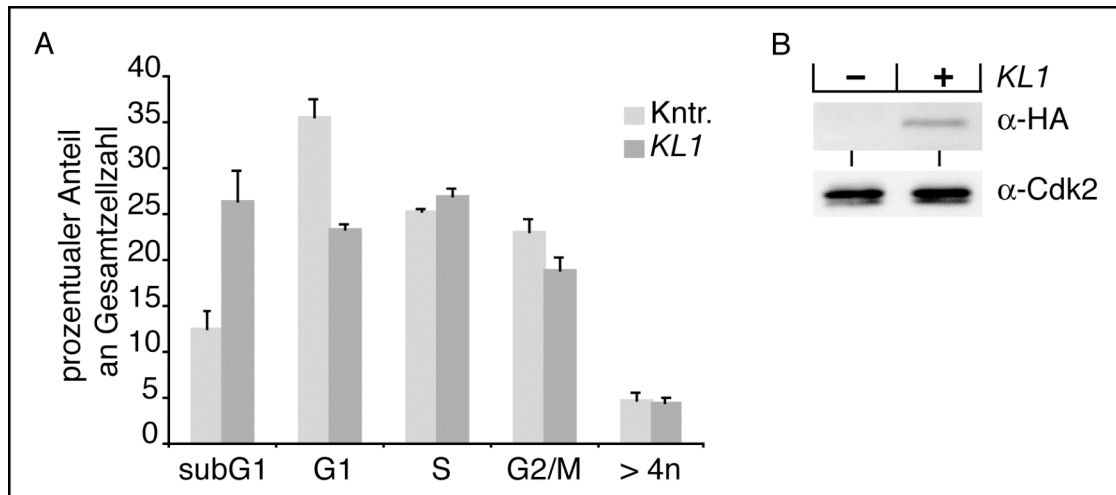


Abb 1.6: Verstärktes apoptotisches Verhalten nach Transfektion mit KL1-Expressionskonstrukt und abgeschlossener Selektion

A: Grafische Auswertung einer in Triplikaten durchgeführten PI-FACS-Analyse von HeLa-Zellen, die mit dem Konstrukt pBabe-puro-3HAKL1 transfiziert und selektioniert wurden. Als Kontrolle dienten mit leerem Vektor transfizierte Zellen (LV). Dargestellt ist der prozentuale Anteil der Zellen in den einzelnen Zellzyklusphasen sowie der apoptotischen Zellen in der subG1-Region. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung der Messwerte an. B: Immunoblot der o.g. HeLa-Zellen nach Abschluss der Puromycinselektion. Der Blot zeigt die Überexpression von KL1, detektiert mit einem anti-HA-Antikörper. Der Nachweis von Cdk2 diente als Ladekontrolle.

3.3 KL1 ist chromatingebunden im Nukleus lokalisiert

Um die Lokalisierung von KL1 in der Zelle zu identifizieren, wurde zunächst eine Immunofluoreszenz durchgeführt. Hierzu wurden Zellen des SH-EP-Zellpools, welcher KL1 nach stabiler Infektion mit dem Konstrukt pBabe-puro-3HAKL1 überexprimiert, sowie Kontrollzellen fixiert und mit einem anti-HA-Antikörper gefärbt. Dieser wurde in einem zweiten Schritt von einem Zweitantikörper gebunden, an dem das Fluorochrom Rhodamin gekoppelt ist. Die DNA wurde mit Hoechst 33258 angefärbt. Ein repräsentativer Ausschnitt der digitalisierten Immunofluoreszenzbilder ist in **Abbildung 1.7** dargestellt. Während die Kontrollzellen nur Hintergrundfärbung zeigten, wiesen die SH-EP-Zellen, die das KL1-Protein überexprimieren, ein deutliches rotes Signal im Nukleus auf. Die nukleäre Lokalisation des Signals konnte durch Überlagerung der Bilder der KL1-Anfärbung mit denen der DNA-Färbung bestätigt werden.

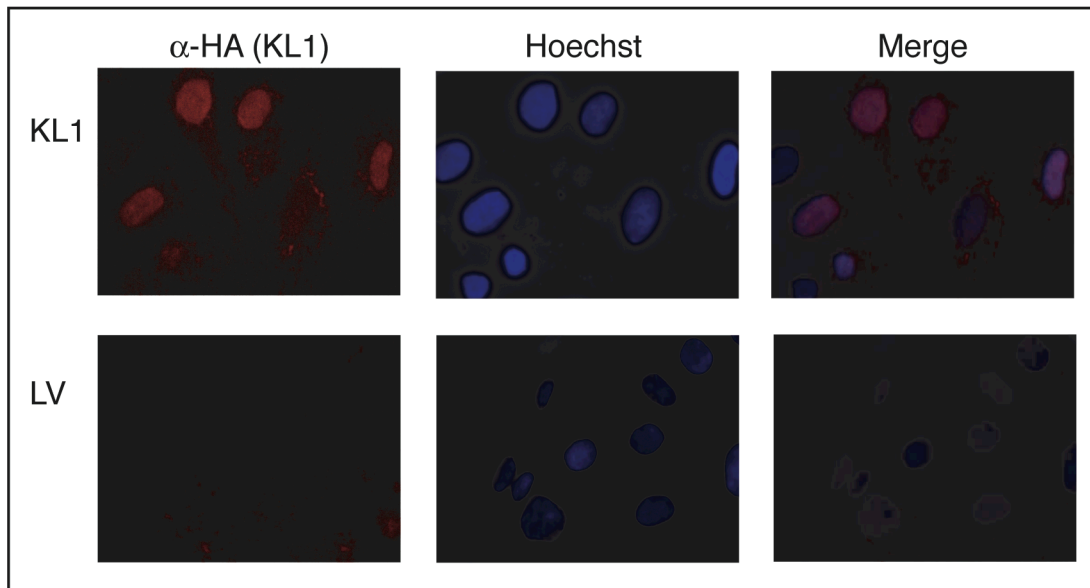


Abb 1.7: KL1 ist im Nukleus lokalisiert

Links: KL1-Färbung mit einem anti-HA-Antikörper und einem Rhodamin-gekoppelten Zweitan-tikörper. Mitte: DNA-Färbung mit Hoechst 33258. Rechts: Die übereinander gelagerten Bilder (Merge). Als Zellen dienten SH-EP-Zellen, stabil infiziert mit dem Konstrukt pBabe-puro-3HAKL1 (KL1) bzw. mit leerem Vektor (LV).

Mit einer subzellulären Fraktionierung konnte das Ergebnis der Immunofluoreszenz bestätigt werden. Diese gab zudem einen Hinweis darauf, dass KL1 in der Zelle chromatinassoziiert vorliegt. Der unter **3.2.4** beschriebene SH-EP-Zellklon (#6), der KL1 im Vektor pcDNA4/TO-3HAKL1 erst nach Zugabe von Doxycyclin exprimiert, wurde in diesem Experiment verwendet. Er wurde für 48h mit 1µg/ml Doxycyclin zur Aktivierung der KL1-Expression bzw. mit Ethanolkontrolle behandelt. Mittels subzellulärer Fraktionierung – erzielt durch den Einsatz von Niedrig- und Hochsalzpuffern (10mM KCl, 0,5% NP-40 bzw. 400mM NaCl) sowie Zentrifugationsschritten – wurden die Zellen in einen zytoplasmatischen Anteil zusammen mit nicht chromatin-gebundenen nukleären Proteinen sowie in einen nukleären Anteil mit chromatingebundenen Proteinen getrennt. In einer Western-Blot-Analyse wurde untersucht, in welcher Fraktion sich KL1 befindet. Das Ergebnis ist in **Abbildung 1.8 links** dargestellt. Der Immunoblot wurde mit einem anti-HA-Antikörper (KL1), einem anti-β-Tubulin-Antikörper und einem anti-HDAC1-Antikörper entwickelt. Das KL1-Protein wurde in der nukleären Fraktion mit chromatingebundenen Proteinen detektiert. Als Kontrolle für den Reinheitsgrad der Fraktionierung wurden HDAC1 als nukleäres chromatingebundenes Protein in der nukleären Fraktion, die chromatingebundene Proteine enthält, nachgewiesen und β-Tubulin als zytoplasmatisches Protein in der

zytoplasmatischen Fraktion mit Anteilen von nukleären, nicht chromatingebundenen Proteinen. Zudem dienten beide Proteine als Ladekontrolle innerhalb der einzelnen Fraktion (-/+ Dox). Mit diesem Experiment wurde KL1 als ein nukleäres, vermutlich chromatinassoziiertes Protein nachgewiesen.

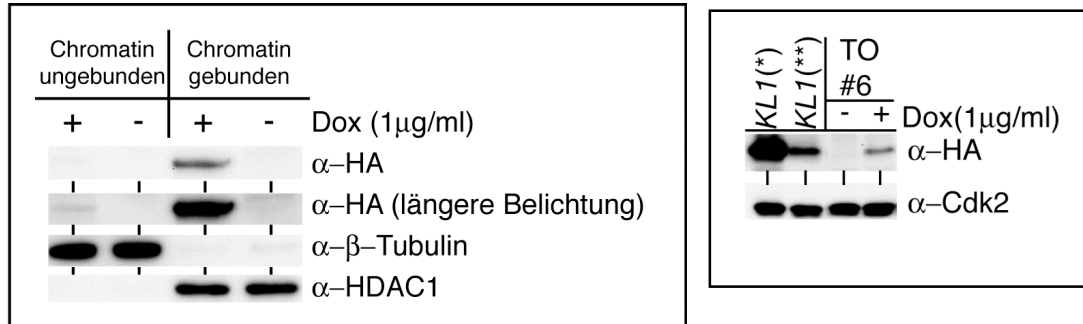


Abb 1.8: KL1 ist ein nukleäres und vermutlich chromatingebundenes Protein

Links: Der Immunoblot zeigt das Ergebnis einer subzellulären Fraktionierung in zytoplasmatische Proteine und nukleäre nicht chromatingebundene Proteine (Chromatin ungebunden) sowie in nukleäre chromatingebundene Proteine (Chromatin gebunden). Der induzierbare SH-EP-Zellklon #6 wurde mit Doxycyclin (+) zur Aktivierung der Überexpression von KL1 bzw. mit Ethanol als Lösungsmittelkontrolle (-) behandelt. Mittels Niedrig- und Hochsalzpuffern sowie Zentrifugationsschritten wurde das Zelllysate in die aufgeführten Anteile getrennt. KL1 wurde mit einem anti-HA-Antikörper, HDAC1 mit einem anti-HDAC1- und β-Tubulin mit einem anti-β-Tubulin-Antikörper nachgewiesen. Rechts: Immunoblot von Zelllysaten aus mit dem Konstrukt 3HapCMV-KL1 (*) transfizierten HEK-293-Zellen, mit dem Konstrukt pBabe-puro-3HAKL1 stabil infizierten SH-EP Zellpool (**) und mit dem Konstrukt pcDNA4/TO-3HAKL1 stabil transfizierten SH-EP-Zellklon #6. Dieser wurde 48h vor der Ernte mit 1μg/ml Doxycyclin (+) zur Induktion der KL1-Expression bzw. mit Ethanol (-) behandelt. Die KL1-Expression wurde mit anti-HA-Antikörper nachgewiesen.

Die Analyse einer nativen Chromatinisolierung bestätigte, dass KL1 in der Zelle chromatingebunden vorliegt. Durch den Einsatz einer Mikrokokkus Nuklease kann mit dieser Methode die Bindung an Chromatin nachgewiesen werden. Der KL1-induzierbare SH-EP-Zellklon #6 wurde zur Aktivierung der KL1-Expression mit 1μg/ml Doxycyclin für vier Tage behandelt. Mit Hilfe geeigneter Lysepuffer und Zentrifugationsschritte wurde zunächst die lösliche zytoplasmatische Fraktion S2 gewonnen. Die noch intakten Nuklei wurden zur Hälfte mit Mikrokokkus Nuklease behandelt (+), die andere Hälfte blieb unbehandelt (-). Mikrokokkus Nuklease ist eine DNase 1, welche die DNA zwischen den Nukleosomen schneidet. Die chromatinassoziierten Proteine wurden nach der Behandlung mit dem Enzym in die nukleoplasmatische Fraktion S3+ entlassen. Dieser lösliche nukleäre Überstand S3+ sowie der unbehandelte lösliche nukleäre Überstand S3- wurden nach der Lyse der Nuklei gewonnen. Der jeweilige verbleibende chromatinhaltige Bestandteil wurde in Sonifizierungspuffer resuspendiert, sonifiziert, zentrifugiert und der Überstand P3+ bzw. P3- gewonnen. Mittels Western-Blot-Analyse wurde untersucht, in welcher Fraktion sich das

KL1-Protein befand. Als nicht chromatinassoziiertes Protein würde KL1 vor allem in der Fraktion S3- vorliegen, als chromatinassoziiertes Protein in den Fraktionen S3+ sowie P3-. KL1 wurde mit einem anti-HA-Antikörper detektiert. Der Nachweis von HDAC1 diente als Positivkontrolle für ein chromatinassoziiertes Protein. Das Ergebnis in **Abbildung 1.9** zeigt, dass sich das KL1-Protein vorwiegend in den Fraktionen S3+ und P3- befand. KL1 liegt demnach chromatinassoziiert in der Zelle vor.

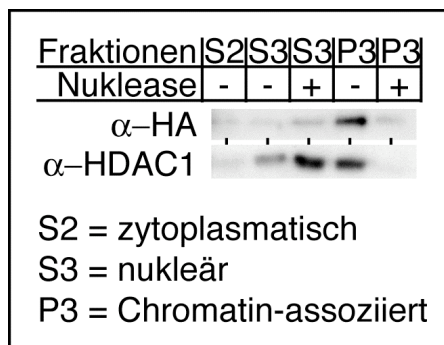


Abb 1.9 KL1 kann an Chromatin binden

Der Immunoblot zeigt das Ergebnis der nativen Chromatinisolierung des induzierbaren SH-EP-Zellklons KL1 #6 nach Doxycyclingabe. Nach Trennung des zytoplasmatischen Anteils (S2) vom nukleären Anteil wurden die intakten Nuklei zur Hälfte mit Mikrokokkus Nuklease (+) behandelt und die löslichen nukleären Überstände (S3+ und S3-) gewonnen. Der chromatinhaltige Bestandteil wurde sonifiziert und die Überstände P3+ bzw. P3- gewonnen. KL1 wurde mit einem anti-HA-Antikörper detektiert. Der Nachweis von HDAC1 diente als Positivkontrolle für ein chromatinassoziiertes Protein.

3.4. KL1 als transkriptioneller Repressor

Im Folgenden wurde mit einem Gal4-Reporter-Assay untersucht, ob das Zinkfinger-Protein KL1 in Säugerzellen ein transkriptioneller Aktivator oder Repressor ist. Hierzu wurden HEK-293-Zellen mit den Konstrukten TK-Luc-Gal (Reporterplasmid mit fünf Gal4-Bindungsstellen), LacZ (für β Gal-Assay, interner Standard), HAGal4pCMV, HAGal4pCMV-*KL1* bzw. Gal4pCMV-*p300* (als Kontrolle für die Funktionsfähigkeit des Reporters) in Triplikaten transfiziert. Die aus dem Luziferase-Assay gewonnenen Rohdaten wurden auf β Gal normalisiert und als relative Aktivität in der **Abbildung 1.10** grafisch dargestellt. Hierbei wurde der Mittelwert der Basalaktivität des Reporterkonstruktes gleich 1 gesetzt. Die Co-Expression von KL1 führte zu einer 10fachen Repression der Basalaktivität des Reporterkonstruktes, die Co-Expression von p300 hingegen zu einer 18fachen Aktivierung des Reporterkonstruktes. Diese Aktivierung wurde durch Co-Expression von KL1 heruntersetzt, da es vermutlich im Zuge der Promotorrepression durch KL1 zu einer Hemmung der Aktivierungsdomäne von p300 kommt. Mittels Western-Blot-Analyse wurde bestätigt, dass KL1 in dem Konstrukt HAGal4pCMV-*KL1* in HEK-293-Zellen exprimiert wird (anti-HA-Antikörper) (**Abbildung 1.10C**). Der Nachweis von endogenem Cdk2 diente als Ladekontrolle. Das Ergebnis dieses Experimentes zeigt, dass KL1 in Säugerzellen als transkriptioneller Repressor agieren kann.

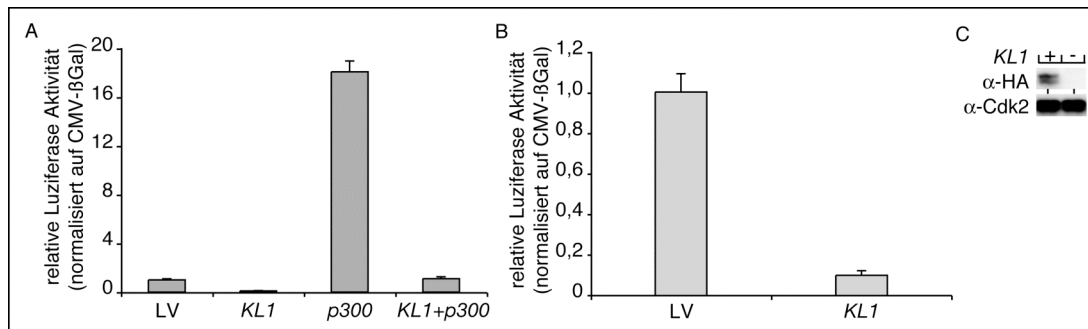


Abb. 1.10: KL1 als Repressor im Gal4-Reporter-Assay

A: Grafische Auswertung eines in Triplikaten durchgeführten Reporter-Assays von HEK-293-Zellen, die mit den Konstrukten TK-Luc-Gal, LacZ, HAGal4pCMV, HAGal4pCMV-*KL1* bzw. Gal4pCMV-*p300* transfiziert wurden. Die Rohdaten der Luziferaseaktivität wurden mit den Daten aus dem βGal-Assay normalisiert. Der Mittelwert der Basalaktivität des Reporterkonstruktes wurde gleich 1 gesetzt. B: Luziferaseaktivität des Reporterkonstrukts mit und ohne Co-Expression von KL1 aus A in größerer Skalierung. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung der relativen Luziferaseaktivität an. C: Der Immunoblot zeigt die Überexpression von KL1 in HEK-293-Zellen nach Transfektion mit dem Konstrukt 3HAGal4pCMV-*KL1*.

3.5 KL1 interagiert mit den Histondeacetylasen HDAC2 und HDAC6

Da KL1 als transkriptioneller Repressor identifiziert worden war, wurde im Folgenden überprüft, ob KL1 mit Co-Repressoren interagieren kann. Diese sind beispielsweise Mitglieder der HDAC-Familie (Minucci S und Pelicci PG, 2006). Um zu testen, ob KL1 und HDACs interagieren können, wurden Co-Immunopräzipitationen (Co-IPs) durchgeführt. Für diese und alle folgenden Co-IPs – sofern nicht anders beschrieben – wurde KL1 in dem Konstrukt 3HApCMV-*KL1* (KL1) eingesetzt. Als Kontrolle diente das Konstrukt 3HApCMV, bezeichnet als leerer Vektor (LV).

HEK-293-Zellen wurden mit KL1 bzw. LV und alternativ mit den Konstrukten pcDNA3.1MycHis-*HDAC2/HDAC4/HDAC6* co-transfiziert bzw. mit dem nicht funktionalen Konstrukt pcDNA3.1MycHis-*HDAC3*, da das Protein nicht exprimiert wurde. Die Co-IP-Analyse der transfizierten HDAC-Konstrukte mit LV diente dazu auszuschließen, dass nicht KL1, sondern der Haemagglutinin-Anhang von KL1 mit den HDACs interagiert. Die Immunopräzipitation erfolgte mit den Antikörpern gegen HA (für KL1), gegen den Myc-Anhang der HDACs, 9E10, sowie mit den Kontrollantikörpern. Als solche dienten der IgG Maus- bzw. der IgG Kaninchen-Antikörper, wenn der Wirt des eingesetzten spezifischen Antikörpers Maus bzw. Kaninchen war. Für die Western-Blot-Analyse wurden die Antikörper gegen den HA-Anhang von KL1 und gegen den His-Anhang der HDACs eingesetzt. Für die Expressionskontrolle wurden in diesem und den folgenden Experimenten 5-10% des Gesamtlysates als Input eingesetzt – sofern nicht anders beschrieben. Das Ergebnis ist in **Abbildung**

1.11A dargestellt. Wie aus dem Input-Immunoblot hervorgeht wurden HDAC2, HDAC4 und HDAC6 sowie KL1 in den HEK-293-Zellen überexprimiert. KL1 konnte mit HDAC2 und HDAC6, nicht aber mit HDAC4 co-immunopräzipitiert werden. Sowohl HDAC2 als auch HDAC6, nicht aber HDAC4 konnten mit KL1 co-immunopräzipitiert werden.

Mit diesem Experiment wurde nachgewiesen, dass der Repressor KL1 mit dem Co-Repressor, der Histondeacetylase HDAC2, interagieren kann. Ebenso kann KL1 mit der Histondeacetylase HDAC6 interagieren, für die bisher keine co-repressive Funktion beschrieben wurde. Stattdessen wurde gezeigt, dass HDAC6 mit beispielsweise den Mikrotubuli interagiert und hierbei α -Tubulin deacetyliert (Hubbert C et al., 2002).

Da die biologischen Assays mit KL1 vorwiegend in SH-EP-Zellen durchgeführt wurden (s.u.), wurde mittels RT-PCR-Analyse untersucht, ob *HDAC2*, *HDAC4* und *HDAC6* endogen in SH-EP-Zellen auf mRNA-Ebene exprimiert werden, um einen Hinweis auf die biologische Relevanz für die beschriebene exogene Interaktion von KL1 mit HDAC2 und HDAC6 zu erhalten. Die RT-PCR-Analyse wurde mit sequenzspezifischen Primern durchgeführt, die Proben nach 32 Zyklen entnommen. **Abbildung 1.11B** zeigt, dass *HDAC2*, *HDAC4* und *HDAC6* in SH-EP-Zellen endogen exprimiert werden.

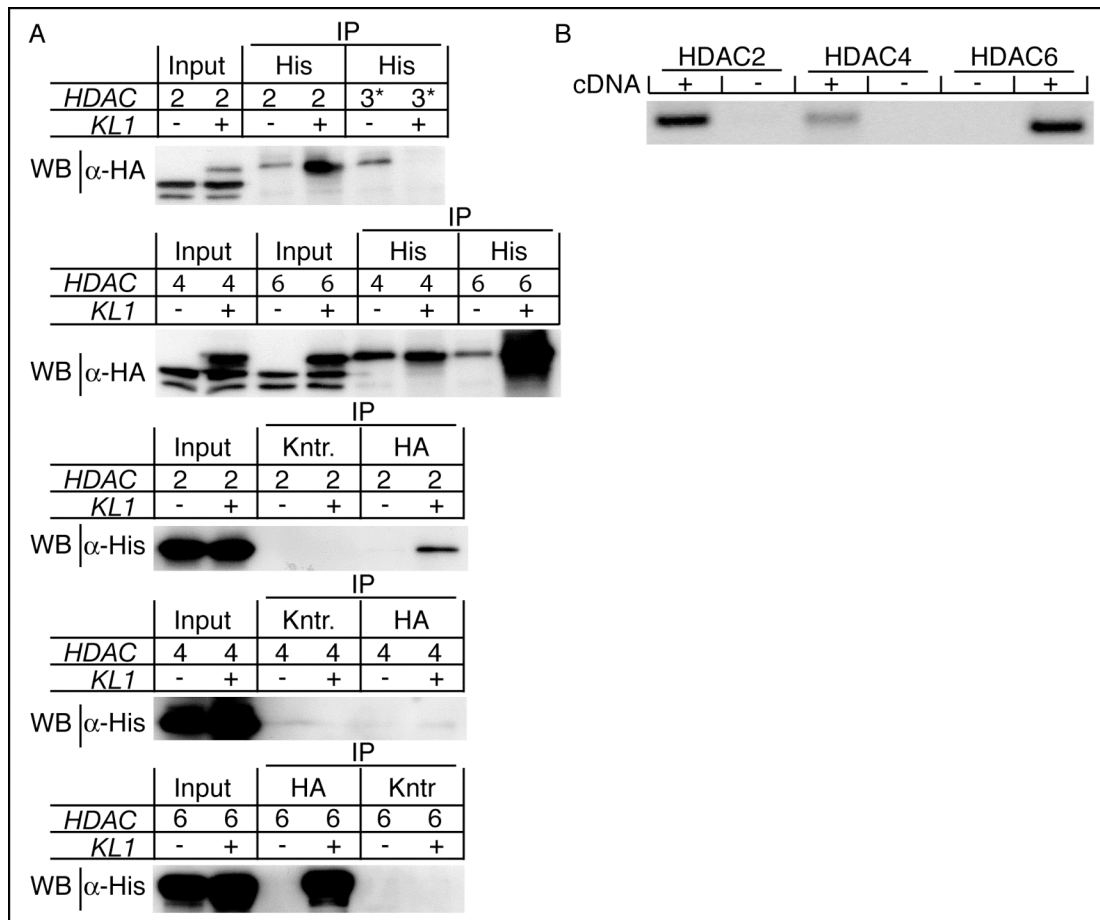


Abb. 1.11: KL1 interagiert mit den Histondeacetylasen 2 und 6

A: Der Immunoblot zeigt den Nachweis von KL1 mit anti-HA-Antikörper nach IP von HDAC2, HDAC4 und HDAC6 mit anti-His-Antikörper sowie den Nachweis von HDAC2, HDAC4 und HDAC6 mit anti-His-Antikörper nach IP von KL1 mit anti-HA-Antikörper. Nach IP mit Kontrollantikörper (Kntr.) konnten die o.g. Proteine nicht detektiert werden. HEK-293-Zellen wurden mit den Konstrukten 3HApCMV-*KL1*(+) bzw. 3HApCMV(-) sowie pcDNA3.1MycHis-*HDAC2*, 3* (nicht funktional), 4 und 6 co-transfiziert. Der Input-Immunoblot zeigt die Expression der Proteine (außer HDAC3). B: Das Gelfoto zeigt die endogene mRNA-Expression von *HDAC2*, 4 und 6 in SH-EP-Zellen. Die Proben der RT-PCR-Analyse wurden nach 32 Zyklen entnommen (+ SH-EP cDNA; - Wasserkontrolle).

3.6 Behandlung von *KL1*-depletierten SH-EP-Zellen mit Chemotherapeutika

Beim Neuroblastom wie auch bei weiteren soliden Tumoren ist die mRNA-Expression von *KL1* in schlecht prognostischen im Vergleich zu gut prognostischen Tumoren herunterreguliert (s. **Einleitung Abbildung 4**). Diese Beobachtung wurde herangezogen, um mehr über die biologische Funktion von KL1 zu erfahren. So wurde *KL1* zunächst in der Zelllinie SH-EP mittels RNA-Interferenztechnik depletiert und die Zellen anschließend mit Chemotherapeutika behandelt, die auch in der Klinik zur Behandlung des Neuroblastoms eingesetzt werden.

Drei verschiedene short-hairpin-RNAs (shRNAs) gegen *KL1* sowie eine „nonsense“-Sequenz, scrambled (SCR), wurden über die Restriktionsenzymststellen BglII und HindIII in den Vektor pRetrosuper-puro kloniert. Es wurden drei verschiedene

shRNAs gegen *KL1* eingesetzt, um „off target“-Effekte auszuschließen. Ebenso diente die scrambled shRNA als Kontrolle, um Effekte auszuschließen, die durch die shRNA *per se* verursacht wurden. SH-EP-Zellen wurden mit den genannten Konstrukten infiziert und mit Puromycin selektioniert. Von diesen Zellen wurden Pools und Klone hochgezogen. Da die Zellpools keine Depletion von *KL* aufwiesen (Daten nicht gezeigt), wurden in den folgenden Experimenten Zellklone eingesetzt. Diese wurden mittels quantitativer Echtzeit-PCR-Analyse (hier in Duplikaten) auf die Depletion von *KL1* getestet. Als Referenzgen diente $\beta 2$ -MIKROGLOBULIN. Ein repräsentatives Ergebnis ist grafisch als relative Expression von *KL1* in **Abbildung 1.12** dargestellt. Die mRNA-Expression von *KL1* ist in den mit shRNA-Konstrukt gegen *KL1* infizierten Zellklonen um ca. 60% im Vergleich zu den Kontrollklonen erniedrigt.

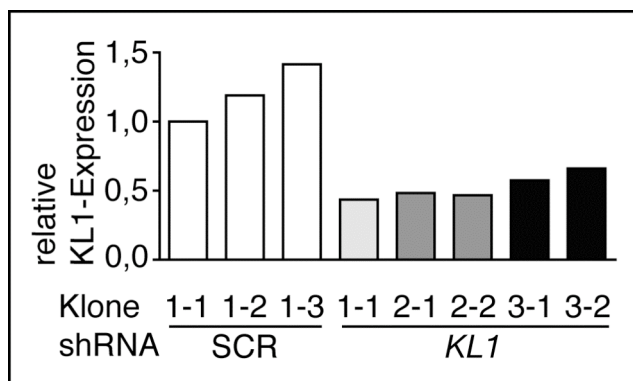


Abb. 1.12: Depletion von *KL1* durch shRNA

Grafische Auswertung der in Duplikaten durchgeführten quantitativen Echtzeit-PCR-Analyse von mit shRNA-Konstrukten gegen *KL1* bzw. scrambled-Kontrolle (SCR) stabil infizierten SH-EP-Zellklonen. Gezeigt wird die relative mRNA-Expression von *KL1* zur Expression des ubiquitär exprimierten Genes $\beta 2$ -MIKROGLOBULIN. (Das Experiment wurde von Dr. Axel Weber durchgeführt.)

Diese *KL1*-depletierten Zellen wurden in einer Wachstumskurve auf ihre Proliferationsfähigkeit getestet und hierzu die Verdopplungszeit bestimmt. Je 1×10^4 Zellen wurden ausplattiert und über einen Zeitraum von sieben Tagen alle 24h in Triplikaten ausgezählt. Folgende SH-EP-Zellen wurden untersucht: shSCR-Klon #1-1, die sh*KL1*-Klone #1-1 und #2-1 sowie ein Zellpool, der mit leerem Vektorkonstrukt stabil infiziert worden war. Das Ergebnis dieses Experimentes ist in einer grafischen Auswertung in **Abbildung 1.13** dargestellt. Demnach zeigten die SH-EP-Zellklone mit *KL1*-Depletion, sh*KL1*-Klone #1-1 und #2-1, keinen signifikanten Unterschied in ihrer Verdopplungszeit im Vergleich zu den Kontrollzellen.

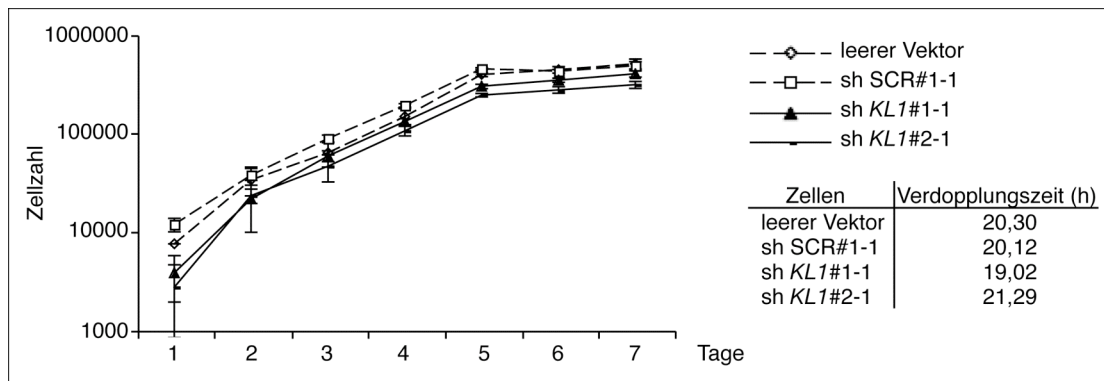


Abb. 1.13: Die Depletion der *KLI*-Expression führt nicht zu einer geringeren Wachstumsrate
 Grafische Darstellung der Wachstumskurve von mit shRNA gegen *KLI* bzw. scrambled-Kontrolle (SCR) stabil infizierten SH-EP-Zellklonen und einem mit leerem Vektor pRetrosuper-puro infizierten Zellpool. Je 1×10^4 SH-EP-Zellen wurden ausplattiert und über einen Zeitraum von sieben Tagen alle 24h in Triplikaten ausgezählt und die Verdopplungszeit berechnet. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung der ermittelten Zellzahl an. Als Klone wurden der shSCR-Kontrollklon #1-1 und die sh*KLI*-Klone #1-1 und #2-1 analysiert. (Das Experiment wurde von Dr. Axel Weber durchgeführt).

Im Folgenden wurden fünf *KLI*-depletierte SH-EP-Zellklone sowie drei Kontrollklone unter der Behandlung mit den Chemotherapeutika all-trans-Retinolsäure (AT-RA), Cisplatin, Etoposid und Vincristin auf ihre Fähigkeit getestet, Kolonien zu bilden. Für den „colony formation“-Assay wurden je $1,5 \times 10^4$ Zellen ausplattiert und mit 3,5nM Vincristin für 10 Tage, mit 40 μ M AT-RA (all-trans-Retinolsäure), 0,2 μ M Etoposid und 0,05 μ M Cisplatin für 14 Tage sowie mit Lösungsmittel (DMSO) für 7 Tage inkubiert, bevor die Platten mit Kristallviolett angefärbt wurden. Das Medium wurde jeden dritten Tag gewechselt und die Substanzen erneut hinzugegeben. DMSO diente als Kontrolle zum Ausschluss von durch das Lösungsmittel und nicht durch die darin gelöste Chemikalie verursachte Effekte. (Die Konzentrationen der einzelnen Chemotherapeutika waren zuvor austitriert worden und die niedrigste effektive Konzentration, die zu einem Absterben der Kontrollzellen führte, in diesem Assay eingesetzt.) Das Ergebnis eines repräsentativen *KLI*-depletierten SH-EP-Zellklons und eines Kontrollklons (SCR) ist in **Abbildung 1.14** dargestellt. Beide Zellklone starben unter der Behandlung von AT-RA, Etoposid und Cisplatin. Im Gegensatz zu den Kontrollzellen überlebten die Zellen des *KLI*-depletierten SH-EP-Zellklons die Behandlung mit Vincristin.

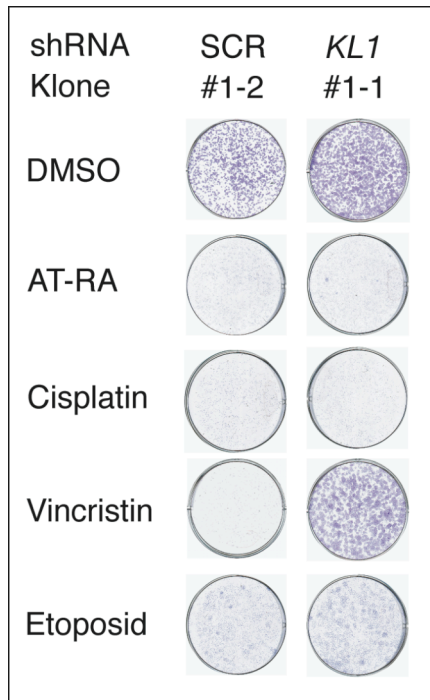


Abb. 1.14: *KL1*-Depletion führt zur Resistenz gegenüber Vincristin

KV-Färbung nach Chemotherapie-Behandlung eines repräsentativen mit shRNA-Konstrukt gegen *KL1* stabil infizierten SH-EP-Zellklons sowie eines repräsentativen mit shRNA-Konstrukt gegen scrambled infizierten Kontrollzellklons. Je $1,5 \times 10^4$ Zellen wurden ausplattiert und mit 3,5nM Vincristin für 10 Tage, mit 40µM AT-RA, 0,2µM Etoposid und 0,05µM Cisplatin für 14 Tage sowie mit Lösungsmittel (DMSO) für 7 Tage inkubiert. (Das Experiment wurde von Dr. Axel Weber durchgeführt).

3.7 Resistenz *KL1*-depletierter Zellen gegenüber niedrig dosiertem Vincristin

Um das Ergebnis der Vincristin-Resistenz von *KL1*-depletierten Zellen zu bestätigen, wurde die shRNA gegen *KL1* mit GFP in SH-EP-Zellen co-exprimiert. Die Zellen wurden mit Vincristin behandelt und während der Dauer der Behandlung auf GFP exprimierende Zellen in der Durchflusszytometrie analysiert. Zunächst wurden die drei verschiedenen shRNA gegen *KL1* sowie eine Kontroll-shRNA über die Restriktionsenzymstellen BglII und HindIII in den Vektor pRetrosuper-GFP kloniert. SH-EP-Zellen wurden mit diesen Konstrukten sowie mit einem H2BGFP exprimierenden Konstrukt infiziert, welches als Kontrolle für durch die Expression von GFP verursachte Effekte diente. 48h nach Infektion wurden je 1×10^5 Zellen ausplattiert und mit 5nM Vincristin bzw. DMSO als Kontrolle behandelt. Die Versuchsdauer betrug 13 Tage. Die Zellen der Lösungsmittelkontrolle wurden bei Erreichen der Konfluenz in einer Zellzahl von 1×10^5 erneut ausplattiert. Alle drei Tage wurde das Medium gewechselt und Vincristin hinzugegeben. Vor Beginn der Behandlung sowie an den Tagen 3, 7, 10 und 13 wurden die mit DMSO bzw. Vincristin behandelten Zellen in der Durchflusszytometrie auf GFP positive Zellen untersucht. Der prozentuale Anteil der GFP positiven Zellen in der Kontrollpopulation wurde von dem prozentualen Anteil der GFP positiven Zellen der zu untersuchenden Population subtrahiert. Die grafische Auswertung des Experimentes ist in **Abbildung 1.15** dargestellt. Zu Beginn der Messung waren ca. 10% der Zellen GFP positiv (siehe unbehandelte Proben).

Über die Zeit der Versuchsdauer kam es unter Vincristinbehandlung zu einer Anreicherung von GFP positiven Zellen in allen drei Zellpools, die mit shRNA-Konstrukten gegen *KL1* infiziert worden waren, gegenüber Zellen, die mit Kontroll-shRNA-Konstrukt infiziert worden waren. Die mit Lösungsmittel behandelten Zellen verhielten sich gleich. Hier kam es zu keiner Anreicherung an GFP positiven Zellen, die mit shRNA-Konstrukten gegen *KL1* infiziert worden waren. Mit diesem Experiment wurde bestätigt, dass die Depletion von *KL1* einen Überlebensvorteil der Zellen gegenüber der Behandlung mit niedrig dosiertem Vincristin verursacht.

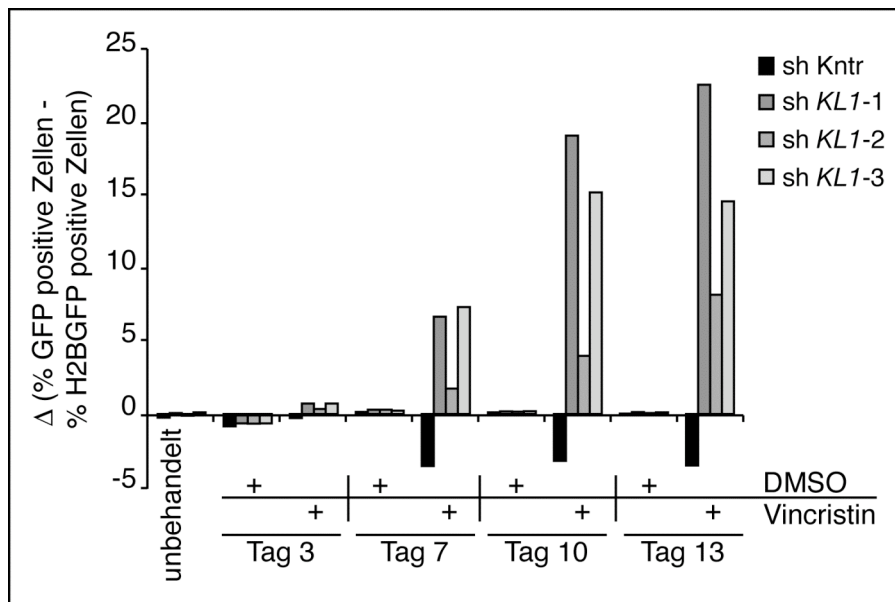


Abb. 1.15: Resistenz *KL1*-depletierter Zellen gegenüber niedrig dosiertem Vincristin

Grafische Auswertung der Messung GFP positiver Zellen unter Vincristinbehandlung mittels Durchflusszytometrie. SH-EP-Zellen wurden mit einem Konstrukt infiziert, welches GFP und shRNA gegen *KL1* (#1, 2, 3) bzw. Kontrolle co-exprimiert. Mit H2BGFP-Konstrukt infizierte SH-EP-Zellen dienten als Kontrollpopulation. Die Zellen wurden mit 5nM Vincristin bzw. DMSO für 13 Tage behandelt. Vor der Behandlung sowie an den Tagen 3, 7, 10 und 13 während der Behandlung wurde die Anzahl an GFP positiven Zellen bestimmt. Auf der x-Achse ist der Zeitpunkt der Messung der mit Vincristin bzw. DMSO behandelten Proben dargestellt. Die y-Achse gibt den prozentualen Anteil an GFP positiven Zellen der zu untersuchenden Population an, von dem der Anteil an GFP positiven Zellen der H2BGFP-Kontrollpopulation subtrahiert wurde.

3.8 *KL1*-depletierte Zellen arretieren in der G1-Phase unter der Behandlung mit niedrig dosiertem Vincristin

Um den Mechanismus zu klären, weshalb *KL1*-depletierte Zellen resistent gegenüber der Behandlung mit niedrig dosiertem Vincristin sind, wurde das Zellzyklusprofil und der Anteil an apoptotischen Zellen der unter 3.6 beschriebenen *KL1*-depletierten SH-EP-Zellklone und Kontrollzellklone analysiert. Hierzu wurden die Zellen für 48h mit niedrig (5nM) und hoch (50nM) dosiertem Vincristin sowie mit DMSO behandelt und anschließend in einer PI-FACS-Analyse untersucht. Das Ergebnis ist in **Abbil-**

dung 1.16 exemplarisch für die Zellklone shSCR 1-2 und sh*KLI* 1-1 dargestellt. Der Kontrollzellklon reagierte apoptotisch auf die Behandlung mit niedrig dosiertem Vincristin, gekennzeichnet durch einen Anstieg in der subG1-Region (DNA-Gehalt $< 2n$) des FACSscan-Profiles. Der Großteil der *KLI*-depletierten SH-EP-Zellklone akkumulierte hingegen in der G1-Phase (DNA-Gehalt = $2n$). Nach der Behandlung mit hoch dosiertem Vincristin arretierten SH-EP-Kontrollklone sowie *KLI*-depletierte Klone in der G2/M-Phase des Zellzyklus (DNA-Gehalt = $4n$) bzw. gingen in Apoptose (sub-G1-Region), wobei im Vergleich zu den Kontrollzellen mehr *KLI*-depletierte Zellen einen G2/M-Arrest eingingen als apoptotisch zu reagieren.

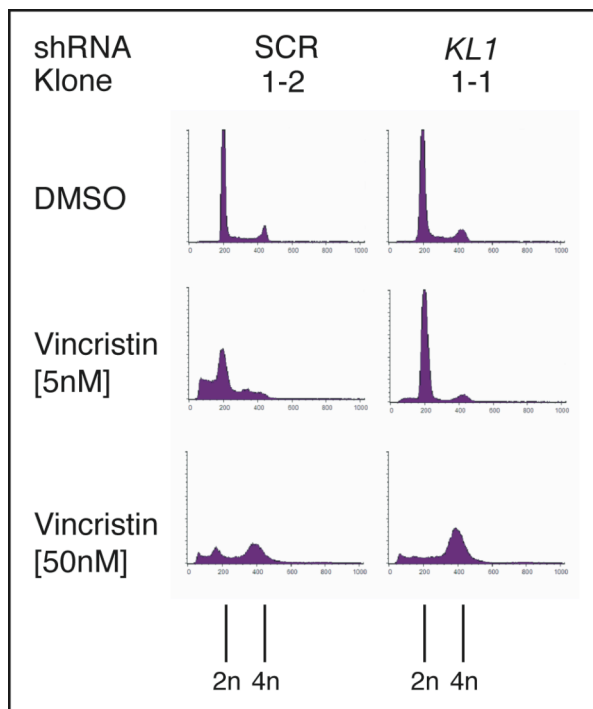


Abb. 1.16: *KLI*-depletierte Zellen reagieren nicht apoptotisch, sondern arretieren in der G1-Phase nach Behandlung mit niedrig dosiertem Vincristin.

Dargestellt sind das Zellzyklusprofil sowie der Anteil an apoptotischen Zellen ($< 2n$) nach einer PI-FACS-Analyse von mit shRNA-Konstrukt gegen *KLI* bzw. scrambled-Kontrolle stabil infizierten SH-EP-Zellklonen, die mit 5nM und 50nM Vincristin bzw. DMSO für 48h behandelt worden waren. (2n, 4n: DNA-Gehalt der Zellen, entspricht G1-Phase und G2/M-Phase des Zellzyklus). (Das Experiment wurde von Dr. Axel Weber durchgeführt.)

3.9 Niedrig dosiertes Vincristin aktiviert p53-Zielgene

Vincristin übt seinen zytostatischen Effekt nicht durch Schädigung der DNA aus, sondern interagiert mit α -Tubulin und β -Tubulin, den Bausteinen der Mikrotubuli, und stört deren Funktion (Jordan A et al., 1998). Niedrig dosiertes Vincristin (5nM) hemmt die Dynamik der Mikrotubuli, indem es die Rate des Anfügens und Abspaltens der einzelnen Tubuline an den Enden der Mikrotubuli herabsetzt. Niedrig dosiertes Vincristin führt zu einer Aktivierung von p53; es erleichtert dessen nukleären Import. Hoch dosiertes Vincristin (50nM) zerstört das Netzwerk der Mikrotubuli, wodurch der Austritt aus der Mitose gestört wird. Hierbei wird p53 jedoch nicht aktiviert (Giannakakou P et al., 2002).

Aktiviertes p53 kann durch Induktion der *P21CIP1*-Expression Zellzyklusarrest und durch Transaktivierung der Genexpression von *PUMA* (Nakano K und Vousden KH, 2001; Yu J et al, 2001) und *NOXA* (Oda E et al, 2000) Apoptose auslösen (Vousden KH und Lu X, 2002; Oren M, 2003). **Abbildung 1.17** zeigt die Aktivierung von p53 und seinen genannten Zielgenen nach Behandlung mit 5nM Vincristin bzw. unter UVB-Bestrahlung. SH-EP-Zellen wurden mit 5nM Vincristin bzw. DMSO für 24h behandelt und in einer Western-Blot-Analyse auf die Expression von p53 und p21Cip1 mit einem anti-p53-Antikörper und einem anti-p21Cip1-Antikörper getestet. Die Detektion von Cdk2 diente als Ladekontrolle (**Abbildung 1.17A**). **Abbildung 1.17B** zeigt, dass auf mRNA-Ebene die Expression der p53-Zielgene *P21CIP1*, *NOXA* und *PUMA* in den SH-EP-Zellen nach Behandlung mit UVB (Dosis 250J/m², 6h) bzw. Vincristin (5nM, 24h) induziert wurde. Als Referenzgen für diese quantitative Echtzeit-PCR-Analyse diente *β2-MIKROGLOBULIN*.

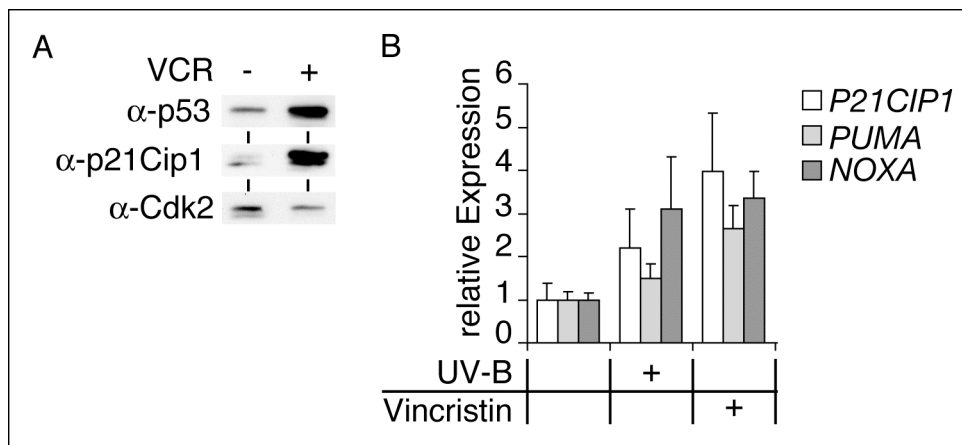


Abb. 1.17: Aktivierung von p53 und seinen Zielgenen nach Behandlung mit Vincristin bzw. UVB
A: Detektion der Proteinexpression von p53 und p21Cip1 mit den angegebenen Antikörpern nach der Behandlung mit 5nM Vincristin bzw. DMSO für 24h in SH-EP-Zellen. Der Nachweis von Cdk2 diente als Ladekontrolle. B: Grafische Darstellung der relativen mRNA-Expression von *NOXA*, *PUMA* und *P21CIP1* in SH-EP-Zellen nach der 24h-Behandlung mit UVB bzw. Vincristin. Als Referenzgen diente *β2-MIKROGLOBULIN*. Die PCR wurde in Triplikaten durchgeführt. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung der relativen Expression an. (Das Experiment entstand in Zusammenarbeit mit Dr. Axel Weber.)

3.10 KL1 reprimiert die Expression von *P21CIP1*

Um den Mechanismus der Resistenz *KL1*-depletierter Zellen gegenüber niedrig dosiertem Vincristin weiter zu klären, wurde untersucht, ob KL1, das als transkriptioneller Repressor in dieser Arbeit identifiziert wurde (s. 3.4), eines der genannten p53-Zielgene reprimiert. Die Analyse eines Microarrays von SH-EP- und SH-SY5Y-Zellen hatte ergeben, dass die Expression von *P21CIP1* in *KL1*-depletierten Zellen im

Vergleich zu Kontrollzellen hochreguliert ist (Dr. Axel Weber, persönliche Kommunikation). Dieses Ergebnis wurde validiert. Die Expression von *P21CIP1* wurde auf mRNA- und Proteinebene in Zellen, die KL1 überexprimieren bzw. in *KL1*-depletierten Zellen untersucht. Die *P21CIP1*-Expression nach Überexpression von KL1 wurde in SH-EP- und LS174T-Zellpools analysiert, welche KL1 nach Infektion mit dem Konstrukt pBabe-puro-3HAKL1 stabil überexprimieren. In einer RT-PCR-Analyse wurden die Zellen auf die mRNA-Expression von *KL1* (34 Zyklen), *P21CIP1* (31 Zyklen), *P27KIP1* (32 Zyklen, nur LS174T-Zellen) sowie $\beta 2$ -MIKROGLOBULIN als Ladekontrolle (28 Zyklen) durch den Einsatz sequenzspezifischer Primer getestet. Das Ergebnis ist in **Abbildung 1.18A** dargestellt. Das Gelfoto zeigt, dass nach stabiler Infektion mit dem genannten KL1-Expressionskonstrukt die LS174T-Zellen *KL1*-mRNA schwächer überexprimieren als die SH-EP-Zellen. Nach der Infektion mit dem KL1-Konstrukt exprimieren die SH-EP-Zellen die mRNA von *P21CIP1* ca. 4fach schwächer, die LS174T-Zellen ca. 2fach schwächer als die jeweiligen Kontrollzellen. In den LS174T-Kontrollzellen wird die endogene *KL1*-mRNA stärker und die *P21CIP1*-mRNA schwächer exprimiert als in den SH-EP-Kontrollzellen. Die mRNA-Expression von *P27KIP1* ist in den Zellen mit KL1-Überexpression nicht verändert. Die gleichen Zellen wurden in einer Western-Blot-Analyse auf die Expression von p21Cip1 (anti-p21Cip1-Antikörper) untersucht. SH-EP- und LS174T-Zellen mit stabiler KL1-Überexpression zeigen eine deutliche Reduktion der p21Cip1-Expression auch auf Proteinebene. Der Nachweis von Cdk2 diente als Ladekontrolle (**Abbildung 1.18B**).

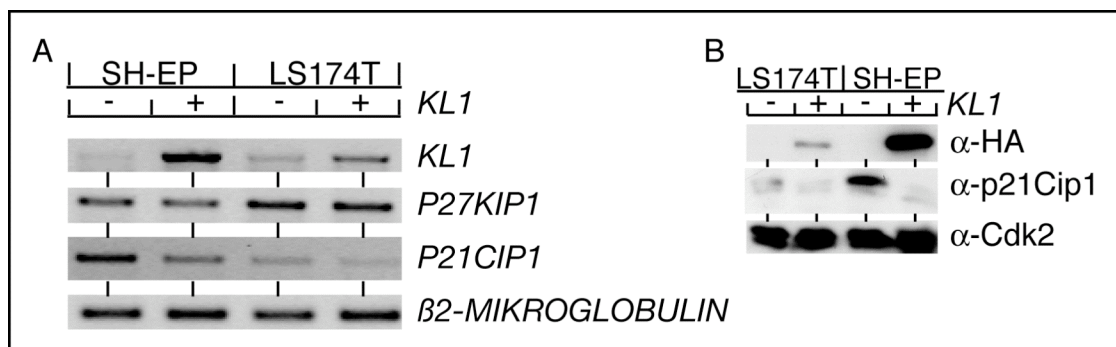


Abb. 1.18: Überexpression von KL1 führt zur Repression der *P21CIP1*-Transaktivierung
A: Das Gelfoto zeigt das Ergebnis einer RT-PCR-Analyse von SH-EP- und LS174T-Zellen, die KL1 (+) stabil überexprimieren. Als Kontrolle dienten mit leerem Vektor stabil infizierte Zellen (-). Die cDNA wurde mit sequenzspezifischen Primern gegen *KL1* (34 Zyklen), *P21CIP1* (31 Zyklen), *P27KIP1* (32 Zyklen, nur LS174T-Zellen) sowie $\beta 2$ -MIKROGLOBULIN als Ladekontrolle (28 Zyklen) amplifiziert. B: Der Immunoblot zeigt die Überexpression von KL1 (anti-HA-Antikörper) sowie die endogene p21Cip1-Expression (anti-p21Cip1-Antikörper). Der Nachweis von Cdk2 diente als Ladekontrolle.

Die *P21CIP1*-Expression nach Depletion von *KL1* wurde durch den Einsatz löslicher siRNAs in SH-EP- und MCF10a-Zellen untersucht. SH-EP- und MCF10a-Zellen wurden mit löslicher siRNA gegen *KL1* bzw. Kontrolle (scrambled) transfiziert. 48h nach Transfektion wurden die Zellen auf die mRNA-Expression von *KL1*, *P21CIP1*, *TP53* (*TP53* nur für MCF10a) und $\beta 2$ -*MIKROGLOBULIN* in einer quantitativen Echtzeit-PCR-Analyse in Triplikaten untersucht. Die Ct-Werte für die *KL1*-, *P21CIP1*- und *TP53*-Expression wurden von denen der $\beta 2$ -*MIKROGLOBULIN*-Expression subtrahiert (*delta* Ct-Wert) und der jeweilige Mittelwert mit Standardabweichung berechnet. Anschließend wurden die Werte als relative Expressionswerte umgerechnet und als solche dargestellt. Hierbei wurde die Expression der untersuchten Gene in den Kontrollzellen gleich 1 gesetzt. Die Ergebnisse sind in **Abbildung 1.19** zu sehen. Nach der Transfektion der löslichen siRNA gegen *KL1* war die mRNA-Expression von *KL1* im Vergleich zur Kontrolle um ca. 60% in SH-EP-Zellen (**Abbildung 1.19A**) und zu ca. 75% in MCF10a-Zellen (**Abbildung 1.19B**) erniedrigt. Die mRNA-Expression von *P21CIP1* war um das ca. 3,5fache in SH-EP-Zellen und um das ca. 1,8fache in MCF10a-Zellen erhöht. Die mRNA-Expression von *TP53* blieb in den MCF10a unverändert. Das Experiment zeigt, dass *KL1* die Expression von *P21CIP1* negativ reguliert.

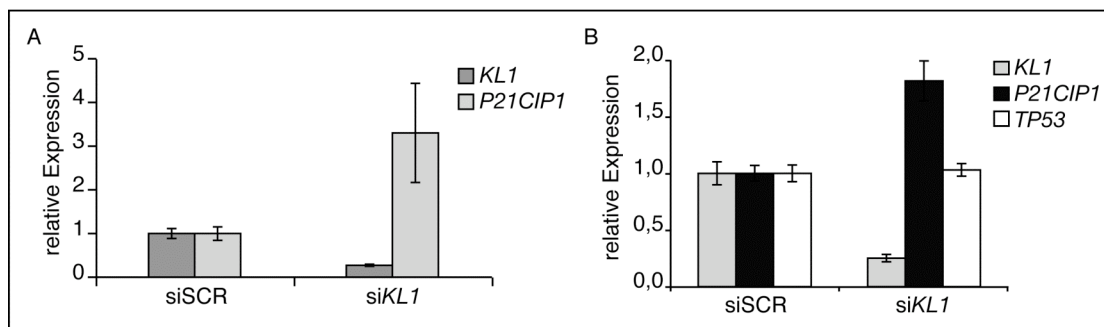


Abb. 1.19: Depletion von *KL1* führt zur Aktivierung der *P21CIP1*-Expression

Grafische Auswertung der in Triplikaten durchgeführten quantitativen Echtzeit-PCR-Analyse von mit löslichen siRNAs gegen *KL1* bzw. Kontrolle (scrambled, SCR) behandelten SH-EP- (A) und MCF10a-Zellen (B). Gezeigt wird die relative mRNA-Expression von *KL1* und *P21CIP1* sowie *TP53* (nur B) zur Expression des ubiquitär exprimierten Genes $\beta 2$ -*MIKROGLOBULIN* 48h nach Transfektion mit löslicher siRNA. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung der relativen Expression an.

Die Expression der p53-Zielgene *PUMA* und *NOXA* wird nicht von *KL1* reguliert wie **Abbildung 1.20** zeigt. Die quantitative Echtzeit-PCR-Analyse wurde mit sequenz-spezifischen Primern gegen *KL1*, *NOXA*, *PUMA* und wiederholt *P21CIP1* in SH-EP- und SH-SY5Y-Zellen, die zuvor für 48h mit löslicher siRNA gegen *KL1* bzw. scrambled-Kontrolle inkubiert worden waren, sowie in dem SH-EP-Zellpool, der *KL1*

nach Infektion mit dem Konstrukt pBabe-puro-3HAKL1 stabil überexprimiert, durchgeführt. Als Referenzgen diente $\beta 2$ -MIKROGLOBULIN.

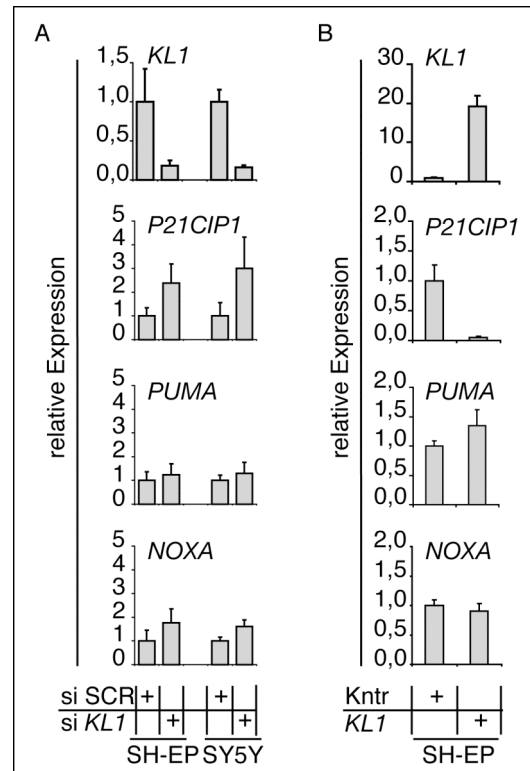


Abb. 1.20: KL1 reguliert nicht die Expression von NOXA und PUMA

Grafische Auswertung der in Triplikaten durchgeführten quantitativen Echtzeit-PCR von Zellen mit hoch- oder herunterregulierter KL1-Expression. A: Relative mRNA-Expression von KL1, P21CIP1, NOXA und PUMA nach Behandlung mit siRNA gegen KL1 bzw. scrambled-Kontrolle für 48h in SH-EP- und SH-SY5Y-Zellen. B: Relative mRNA-Expression von KL1, P21CIP1, NOXA und PUMA in SH-EP-Zellen, die KL1 stabil überexprimieren bzw. in Kontrollzellen. Als Referenzgen diente $\beta 2$ -MIKROGLOBULIN. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung der relativen Expression an. (Das Experiment wurde von Dr. Axel Weber durchgeführt).

Um nachzuweisen, dass KL1 die Expression von P21CIP1 auch unter Vincristinbehandlung reguliert, wurden der SH-EP-Zellklon shKL1 #1-1 (+) und der Kontrollklon shSCR #1-2 (-) (**Abbildung 1.21A**) sowie SH-EP-Zellen, die KL1 stabil überexprimieren (+), und Kontrollzellen (-) (**Abbildung 1.21B**) für 48h mit 5nM Vincristin behandelt. Als Referenzgen diente $\beta 2$ -MIKROGLOBULIN. Die Abbildung zeigt, dass die Expression von P21CIP1 unter 5nM Vincristin induziert wird und dass diese Induktion in KL1-depletierten Zellen verstärkt und in Zellen, die KL1 überexprimieren, erniedrigt ist. Demnach reguliert KL1 die P21CIP1-Expression auch unter Behandlung mit niedrig dosiertem Vincristin.

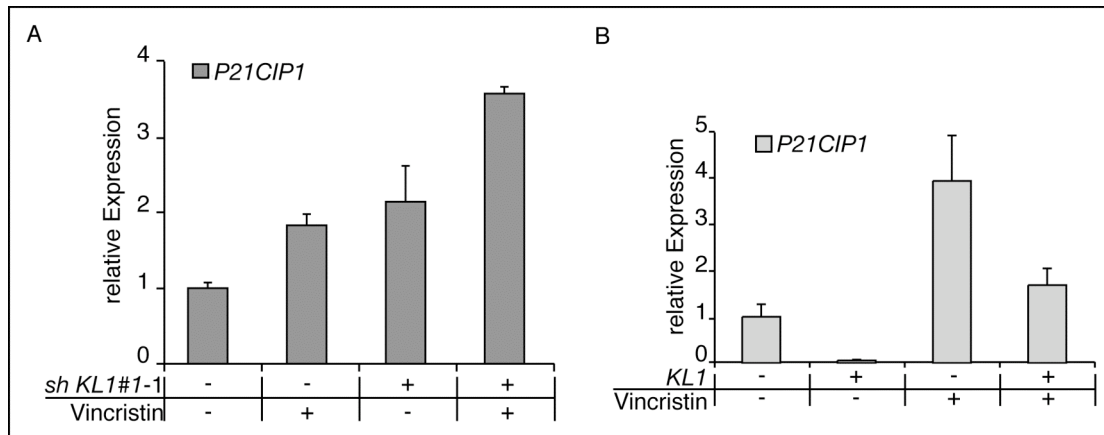


Abb. 1.21: Regulation der *P21CIP1*-Expression durch *KL1* unter Vincristinbehandlung

Relative *P21CIP1*-Expression des *KL1*-depletierten SH-EP-Zellklons shKL1 #1-1 (+) und Kontrollklons shSCR#1-2 (-) (A) sowie des *KL1* überexprimierenden SH-EP-Zellpools (+) bzw. Kontrollpools (-) (B) nach Behandlung mit 5nM Vincristin bzw. DMSO für 48h. Als Referenzgen diente β 2-MIKROGLOBULIN. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung der relativen Expression an. Die quantitative Echtzeit-PCR wurde in Triplikaten durchgeführt. (Das Experiment wurde von Dr. Axel Weber durchgeführt.)

3.11 Die Expression von *P21CIP1* trägt zur Resistenz *KL1*-depletierter Zellen gegenüber Vincristin bei

In dem folgenden Experiment wurde untersucht, ob die Regulation der *P21CIP1*-Expression durch *KL1* in kausalem Zusammenhang mit der Resistenz der *KL1*-depletierten Zellen gegenüber der Vincristinbehandlung steht. Die Expression von *P21CIP1* wurde mittels shRNA depletiert. Dies erfolgte in *KL1*-depletierten SH-EP-Zellklonen sowie in Kontrollklonen. Hierfür wurden drei verschiedene shRNA gegen *P21CIP1* (zum Ausschluss von „off target“-Effekten) bzw. scrambled-Kontrolle über die Restriktionsenzymststellen BglII und HindIII in den Vektor pSuperNeoGFP kloniert. SH-EP-Zellen wurden mit diesen Konstrukten transfiziert und in einer Western-Blot-Analyse auf Depletion von p21Cip1 getestet. Die Zellen lagen hierzu unbehandelt und exponentiell wachsend, konfluent und mit UVB bestrahlt (Dosis 250J/m², 6h Inkubationszeit) vor. Wie **Abbildung 1.22** zeigt, war die Expression von p21Cip1 (anti-p21Cip1-Antikörper) in den mit shRNA-Konstrukt gegen *P21CIP1* transfizierten Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen unter allen drei Bedingungen und mit allen drei verschiedenen gegen *P21CIP1* gerichteten shRNAs reduziert. Der Nachweis von β -Tubulin diente als Ladekontrolle.

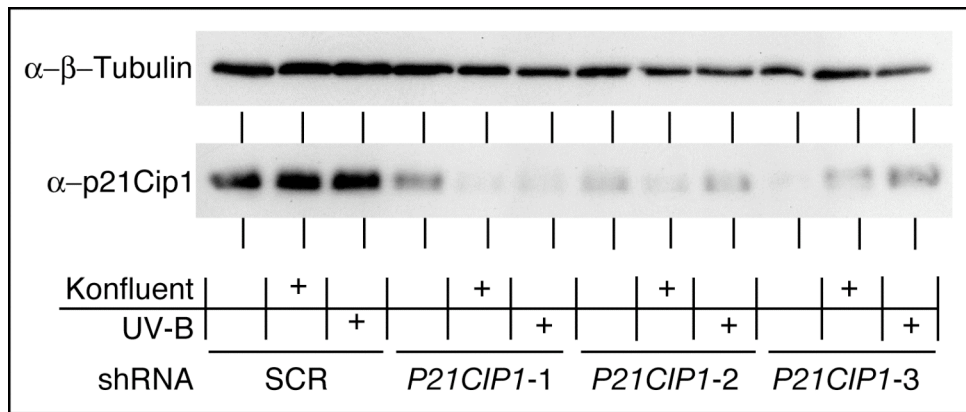


Abb. 1.22: Depletion von p21Cip1 durch shRNA

Der Immunoblot zeigt die Expression von p21Cip1 (anti-p21Cip1-Antikörper) in SH-EP-Zellen, die mit drei verschiedenen shRNA gegen *P21CIP1* sowie gegen scrambled-Kontrolle (SCR) transfiziert wurden. Diese Zellen lagen als exponentiell wachsende mit und ohne UVB-Bestrahlung sowie als konfluente Zellen vor. Der Nachweis von β -Tubulin diene als Ladekontrolle. (Das Experiment wurde von Dr. Axel Weber durchgeführt.)

Die *KL1*-depletierten Zellklone shKL1 #1-1, #2-1 und #2-2 sowie die Kontrollklone shSCR #1-1, #1-2 und #1-3 wurden mit den shRNA-Konstrukten gegen *P21CIP1* transfiziert und nach 30h mit 5nM Vincristin für 72h behandelt. Die Zellen wurden zusammen mit ihrem Überstand in Triplikaten in der Durchflusszytometrie untersucht. Hierbei wurde die Überlebensrate der Zellen bestimmt. Dazu wurden die unfixierten Zellen mit Propidiumiodid als Marker für tote Zellen angefärbt. In **Abbildung 1.23** ist der prozentuale Anteil der lebenden Zellen grafisch dargestellt. Wie unter **3.6** und **3.7** beschrieben überlebten deutlich mehr SH-EP-Zellklone, die mit shRNA gegen *KL1* infiziert waren, die Vincristinbehandlung als Kontrollzellklone. Dieser Überlebensvorteil wurde nach zusätzlicher Transfektion von shRNA-Konstrukten gegen *P21CIP1* deutlich reduziert. Insgesamt überlebten sowohl von den mit shRNA-Konstrukt gegen *KL1* stabil infizierten Zellklonen als auch von den Kontrollklonen deutlich weniger Zellen, wenn diese zusätzlich mit shRNA-Konstrukt gegen *P21CIP1* transfiziert wurden. Das Ergebnis zeigt, dass die erhöhte Expression von *P21CIP1* nach Depletion von *KL1* einen Teil zur Resistenz gegenüber Vincristin beiträgt.

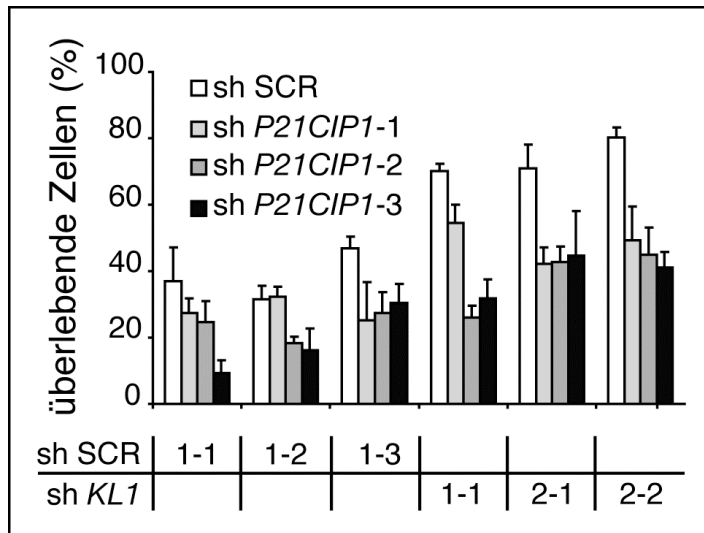


Abb. 1.23: Die *P21CIP1*-Expression trägt zur Resistenz gegenüber Vincristin bei

Die Grafik stellt den prozentualen Anteil der lebenden SH-EP-Zellen nach Vincristinbehandlung dar. SH-EP-Zellklone mit und ohne *KL1*-Depletion wurden zusätzlich mit shRNA-Konstrukten gegen *P21CIP1* bzw. scrambled (SCR) transfiziert und 30h später für 72h mit 5nM Vincristin behandelt. Anschließend wurden die unfixierten Zellen mit Überstand in Triplikaten in der PI-FACS-Analyse untersucht. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung der Messwerte an. (Das Experiment entstand in Zusammenarbeit mit Dr. Axel Weber.)

3.12 *KL1* überexprimierte Zellen reagieren unempfindlich auf eine p53-Aktivierung durch Nutlin-3

Da erstens Vincristin durch Aktivierung von p53 u.a. einen p21Cip1 vermittelten Zellzyklusarrest induzieren kann, zweitens *KL1*-depletierte Zellen auf eine Vincristinbehandlung mit einem Arrest in der G1-Phase anstatt Apoptose reagieren und drittens *KL1* die Expression von *P21CIP1* negativ reguliert, wurde im Folgenden untersucht, ob *KL1* durch Depletion von *P21CIP1* in diesen p53-Signalweg eingreift. Als Aktivator von p53 diene Nutlin-3, das als Hdm2-Antagonist agiert, indem es Hdm2 in seiner p53-Bindungstasche bindet und damit die Interaktion mit p53 verhindert. Dies führt zu einer Stabilisierung und Aktivierung von p53 (Vassilev LT et al., 2004).

Um die geeignete Konzentration an Nutlin-3 herauszufinden, die zu einem Zellzyklusarrest führt, wurden SH-EP-Zellen für 72h mit 0,5µM, 4µM und 10µM Nutlin-3 bzw. mit DMSO als Lösungsmittelkontrolle behandelt und anschließend mit Kristallviolett gefärbt. Da p53 in HEK-293-Zellen nicht funktional ist (Graham FL et al., 1977; Sarnow P et al., 1982), wurden sie auf dieselbe Weise behandelt, um unspezifische zytotoxische Effekte aufgrund einer zu hohen Konzentration an Nutlin-3 zu erkennen und auszuschließen. Das Ergebnis ist in **Abbildung 1.24** dargestellt. Während

die Behandlung mit 0,5 μ M Nutlin-3 noch keinen Wachstumsunterschied zur Lösungsmittelkontrolle verursacht, ist dieser in den SH-EP-Zellen bei einer Konzentration von 4 μ M Nutlin-3 deutlich sichtbar. Da bei einer Konzentration von 10 μ M Nutlin-3 auch in den HEK-293-Zellen ein Wachstumsnachteil auftritt, wurde in den folgenden Experimenten mit einer Konzentration von 4 μ M (maximal 8 μ M) Nutlin-3 gearbeitet.

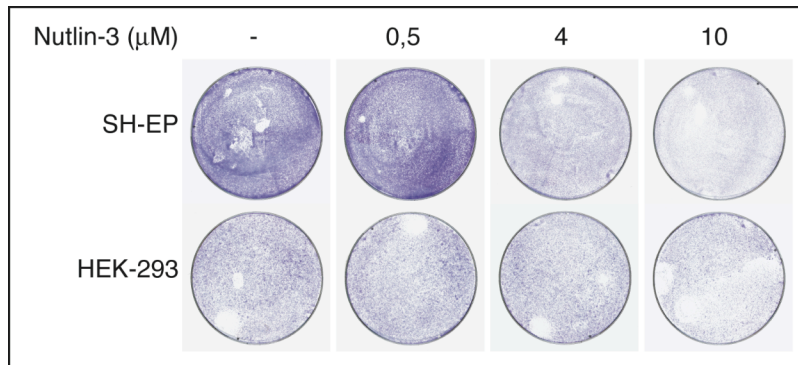


Abb. 1.24: Nutlin-3 Titration

KV-Anfärbung von SH-EP- und HEK-293-Zellen. Diese wurden zuvor für 72h mit 0,5 μ M, 4 μ M und 10 μ M Nutlin-3 bzw. DMSO (-) behandelt.

Das Zellzyklusprofil sowie der Anteil an apoptotischen Zellen wurde in der Durchflusszytometrie von SH-EP-Zellen, die KL1 stabil überexprimieren, sowie von Kontrollzellen nach Behandlung mit Nutlin-3 untersucht. Die Zellen wurden in Triplikaten ausplattiert und für 33h sowie 50h mit 4 μ M, 8 μ M Nutlin-3 bzw. DMSO behandelt und 1h vor der Ernte mit 20 μ M BrdU inkubiert. **Abbildung 1.25** zeigt das Ergebnis der BrdU-PI-FACS-Analyse. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der Zellen in den einzelnen Zellzyklusphasen sowie der apoptotischen Zellen (subG1-Region). Während die Kontrollzellen nach Nutlinbehandlung in der G1-Phase akkumulierten (ca. 80% der Zellen), verhielten sich die KL1 überexprimierenden Zellen nach Nutlinbehandlung wie nach Kontrollbehandlung. Hier befanden sich ca. 50% der Zellen in der G1-Phase. Das Ergebnis zeigt, dass KL1 die zelluläre Antwort nach Aktivierung von p53 beeinflusst.

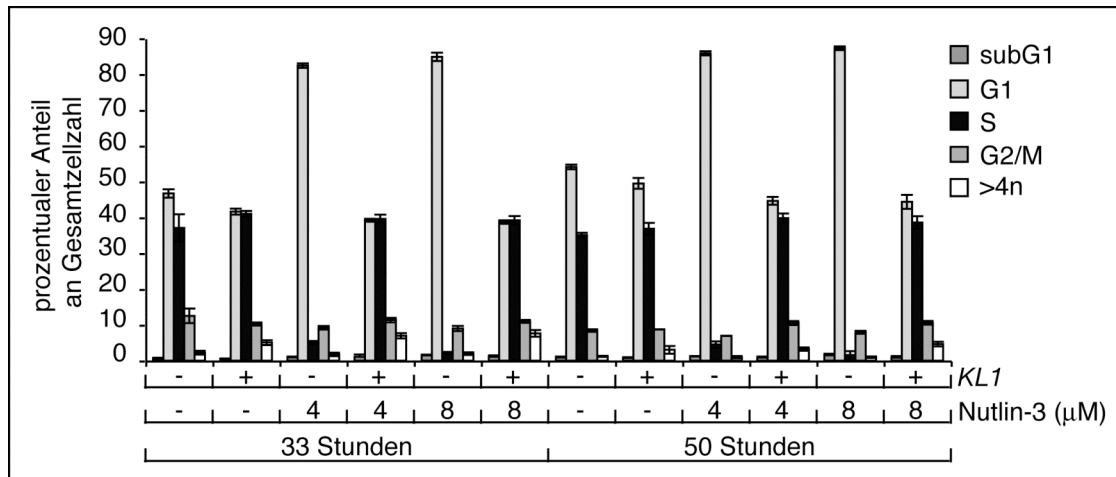


Abb. 1.25: KL1 überexprimierende Zellen sind unempfindlich gegenüber Nutlin-3-Behandlung
 Grafische Auswertung einer in Triplikaten durchgeführten PI-BrdU-FACS-Analyse von SH-EP-Zellen, die KL1 stabil überexprimieren (+), sowie von Kontrollzellen (-). Die Zellen wurden mit 4μM oder 8μM Nutlin-3 bzw. mit DMSO für 33h und 50h behandelt und 1h vor der Ernte mit 20μM BrdU inkubiert. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der Zellen in den einzelnen Zellzyklusphasen bzw. der prozentuale Anteil der apoptotischen (subG1-Region) und polyploiden Zellen (DNA-Gehalt >4n) an der Gesamtzellzahl. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung der Messwerte an.

Um auszuschließen, dass der beschriebene Effekt dadurch entstand, dass p53 in dem SH-EP-Zellpool mit stabiler KL1-Überexpression mutiert und damit nicht mehr funktional ist, wurde eine Western-Blot-Analyse durchgeführt. In dieser wurde p53 mit einem anti-p53-Antikörper, p21Cip1 mit einem anti-p21Cip1-Antikörper und KL1 mit einem anti-HA-Antikörper nachgewiesen. Hierbei wurden die gleichen Zellen wie für die BrdU-PI-FACS-Analyse verwendet (33h Nutlinbehandlung). Das Ergebnis ist in **Abbildung 1.26** dargestellt. Während nach Nutlinbehandlung in den Kontrollzellen sowohl die Expression von p53 als auch von p21Cip1 hochreguliert war, war in den Zellen, die KL1 stabil überexprimieren, nur die Expression von p53 hochreguliert. Die p21Cip1-Expression war in diesen Zellen extrem schwach und wurde auch nicht nach Behandlung mit Nutlin-3 induziert. Überexprimiertes KL1 konnte in den mit KL1-Expressionskonstrukt stabil infizierten SH-EP-Zellen nachgewiesen werden. Die Detektion der Cdk2-Expression diente als Ladekontrolle. Das Ergebnis zeigt, dass p53 in dem SH-EP-Zellpool, der KL1 stabil überexprimiert, funktional ist, und die KL1-Überexpression zur Repression der *P21CIP1*-Expression führt.

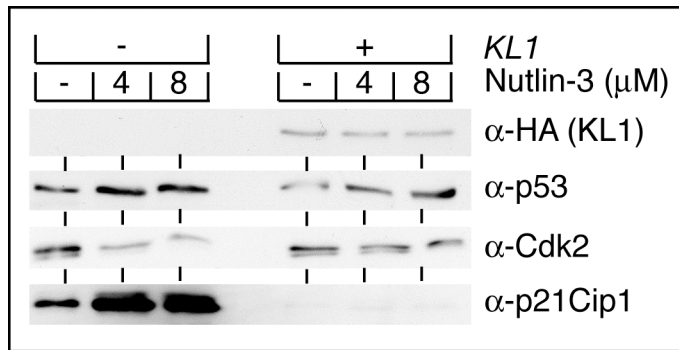


Abb. 1.26: Induktion von p53 in KL1 überexprimierenden Zellen unter Nutlin-3-Behandlung
 Der Immunoblot zeigt die Detektion von KL1, von p53 und p21Cip1 mit den angegebenen Antikörpern in SH-EP-Zellen, die KL1 stabil überexprimieren (+), sowie in Kontrollzellen (-). Die Zellen wurden zuvor mit 4μM, 8μM bzw. DMSO für 33h behandelt. Der Nachweis der Cdk2-Expression diente als Ladekontrolle.

Um herauszufinden, ob die Überexpression von KL1 auch die p53-Antwort nach Schädigung der DNA modulieren kann, wurden SH-EP-Zellen, die KL1 stabil überexprimieren, und Kontrollzellen einem durch Adriamycin (Doxorubicin) verursachten DNA-Schaden ausgesetzt. Die exponentiell wachsenden Zellen wurden mit 0,5μg/ml Adriamycin behandelt und nach 6h für eine BrdU-PI-FACS-Analyse geerntet. Daneben wurden nochmals weitere Zellen für 33h mit 4μM Nutlin-3 bzw. DMSO behandelt. Die grafische Auswertung des Ergebnisses ist in **Abbildung 1.27** dargestellt. Zellen, die KL1 überexprimieren, arretierten im Vergleich zu Kontrollzellen verstärkt in der S-Phase und weniger in der G1-Phase unter Adriamycinbehandlung. Wie bereits gezeigt, verhielten sich die Zellen, die KL1 überexprimieren, nach Nutlin-3-Behandlung wie nach DMSO-Kontrollbehandlung, wohingegen die Kontrollzellen auf die Nutlin-3-Behandlung mit einem G1-Arrest reagierten. Der Immunoblot in **Abbildung 1.28** zeigt, dass p53 unter Adriamycin-Behandlung in den KL1 überexprimierenden Zellen und in den Kontrollzellen aktiviert wurde. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass KL1 den p53 induzierten G1-Arrest blockiert.

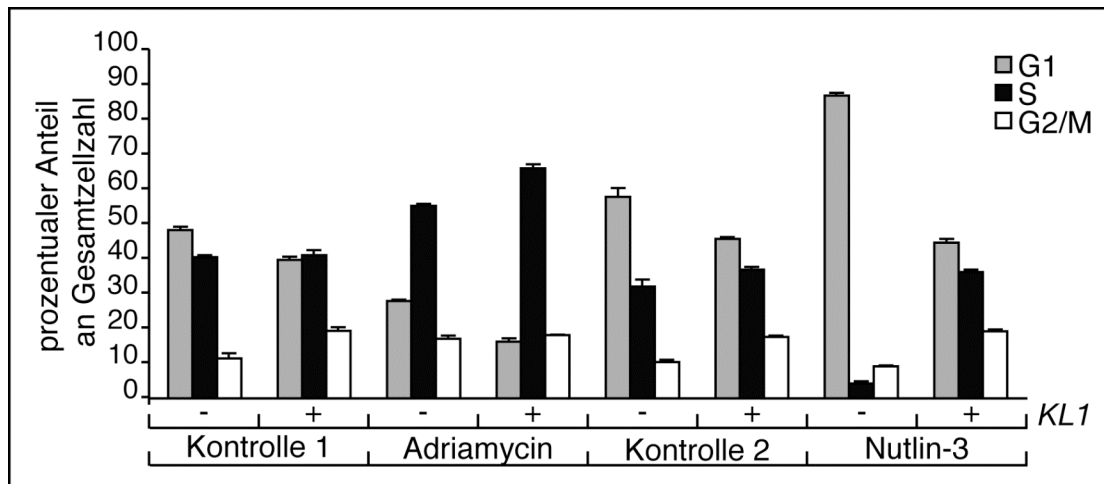


Abb. 1.27: KL1 überexprimierende Zellen arretieren nach Adriamycinbehandlung in der S-Phase

Grafische Auswertung der in Triplikaten durchgeführten PI-BrdU-FACS-Analyse von SH-EP-Zellen, die KL1 stabil überexprimieren (+), und von Kontrollzellen (-) nach Behandlung mit Adriamycin (0,5µg/ml) bzw. unbehandelt (Kontrolle 1) für 6h bzw. nach Behandlung mit 4µM Nutlin-3 bzw. DMSO (Kontrolle 2) für 33h. Gezeigt wird der prozentuale Anteil der Zellen an der Gesamtzellzahl in den einzelnen Zellzyklusphasen. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung der Messwerte an.

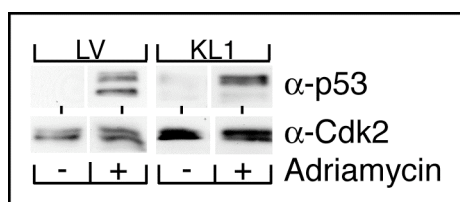


Abb. 1.28: Aktivierung von p53 nach Behandlung mit Adriamycin

Der Immunoblot zeigt die Expression von p53 (anti-p53-Antikörper) in Zellen, die KL1 stabil überexprimieren, sowie in Kontrollzellen. Die Detektion von Cdk2 diente als Ladekontrolle

3.13 KL1 reprimiert unabhängig von p53 die Expression von *P21CIP1*

Im Folgenden wurde untersucht, ob p53 für die Regulation der *P21CIP1*-Expression durch KL1 notwendig ist oder ob KL1 unabhängig von p53 die *P21CIP1*-Expression reguliert. Hierzu wurde die Expression von *P21CIP1* in *KL1*-depletierten Zellen und ohne funktionalem p53 untersucht.

HCT116 Wildtyp und HCT116 p53^{-/-} Zellen, in denen beide Allele von p53 funktionell deletiert sind (Bunz F et al., 1998), wurden mit löslicher siRNA gegen *KL1* bzw. scrambled-Kontrolle transfiziert. In einer quantitativen Echtzeit-PCR-Analyse wurde die mRNA-Expression von *KL1* und *P21CIP1* 48h nach Transfektion untersucht. **Abbildung 1.29A** zeigt die relative Expression von *KL1* und *P21CIP1*. Die Expression von *P21CIP1* war unter *KL1*-Depletion auch in den p53-defizienten HCT116 p53^{-/-} Zellen erhöht. Als Referenzgen diente *β2-MIKROGLOBULIN*. Der Immunoblot in **Abbildung 1.29B** belegt die fehlende Expression von p53 in diesen Zellen. Die Ergebnisse zeigen, dass KL1 die *P21CIP1*-Expression unabhängig von p53 reprimiert.

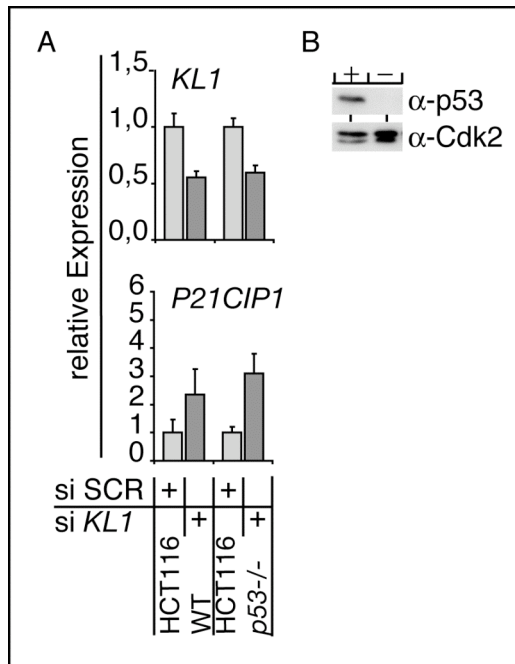


Abb. 1.29: KL1 reprimiert unabhängig von p53 die *P21CIP1*-Expression

A: Grafische Darstellung der relativen mRNA-Expression von *KL1* und *P21CIP1* 48h nach Transfektion von löslicher siRNA gegen *KL1* bzw. scrambled-Kontrolle in HCT116 Wildtyp-Zellen und HCT116 p53^{-/-}-Zellen. Als Referenzgen diente β 2-MIKROGLOBULIN. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung der relativen Expression an. Die quantitative Echtzeit-PCR wurde in Triplikaten durchgeführt. B: Der Immunoblot zeigt die fehlende Expression von p53 in HCT116 p53^{-/-} Zellen (-). HCT116 WT Zellen (+). Der Nachweis von Cdk2 diente als Ladekontrolle. (Das Experiment entstand in Zusammenarbeit mit Dr. Axel Weber.)

3.14 KL1 hemmt die Miz1 vermittelte Transaktivierung von *P21CIP1* und bindet an den *P21CIP1*-Promotor *in vitro*

In Abschnitt 3.4 wurde anhand eines Gal4-Reporter-Assays gezeigt, dass KL1 die Transkription reprimieren kann. Um zu untersuchen, ob KL1 auch die Aktivität des *P21CIP1*-Promotors reguliert, wurde ein *P21CIP1*-Reporter-Assay durchgeführt. Als *P21CIP1*-Reporterkonstrukt diente ein Fragment, welches die Positionen -94 bis +16 relativ zur Transkriptionsstartstelle des humanen *P21CIP1*-Promotors umfasst. Als Positivkontrolle diente Miz1, ein weiterer Zinkfinger-Transkriptionsfaktor mit POZ-Domäne. Für Miz1 wurde beschrieben, dass es die Expression von *P21CIP1* nach DNA-Schaden aktiviert (Herold S et al., 2002; Wanzel M et al., 2005). SH-EP-Zellen und HEK-293-Zellen wurden in Triplikaten mit folgenden Konstrukten transfiziert: *P21CIP1*-Reporterkonstrukt, LacZ (für β Gal-Assay, interner Standard), 3HApCMV, sowie in je zwei ansteigenden Mengen 3HApCMV-*KL1* und pUHD-MIZ1 (als Positivkontrolle). Mit den Zelllysaten wurde sowohl ein Luziferase-Assay als auch ein β Gal-Assay zur Normalisierung der Rohdaten der Luziferaseaktivität durchgeführt. Das Ergebnis ist in **Abbildung 1.30** dargestellt. **Abbildung 1.30A** zeigt eine Skizze des humanen *P21CIP1*-Promotors mit Bindungsstellen der Transkriptionsfaktoren p53, Miz1 sowie mit zwei potenziellen Bindungsstellen für KL1 (s.u.). **Abbildung 1.30B** zeigt die grafische Auswertung des in SH-EP-Zellen durchgeführten Reporter-Assays. Zu sehen ist der Mittelwert der Luziferaseaktivität, die auf CMV- β Gal normalisiert wurde. KL1 reprimierte die Basalaktivität des *P21CIP1*-Promotorfragmen-

tes in Abhängigkeit von der Menge an transfiziertem KL1-Expressionskonstrukt. Miz1 aktivierte das *P21CIP1*-Promotorfragment. Die Luziferaseaktivität stieg mit zunehmender Menge an transfiziertem Expressionskonstrukt für Miz1 an. Die Co-Expression von KL1 führte zu einer Repression der durch Miz1 induzierten Luziferaseaktivität, ebenfalls dosisabhängig. **Abbildung 1.30C** zeigt die grafische Auswertung der Ergebnisse des in HEK-293-Zellen durchgeführten Reporter-Assays. Der Mittelwert der jeweiligen Luziferaseaktivität wurde bestimmt und auf CMV-βGal normalisiert. Anschließend wurde der Mittelwert der Basalaktivität des Promotors gleich 1 gesetzt und anhand dieses Wertes die relative Luziferaseaktivität der restlichen Proben bestimmt. In diesem Experiment reprimierte KL1 nicht die Basalaktivität des *P21CIP1*-Promotorfragmentes. Dennoch reprimierte KL1 dosisabhängig die Miz1-induzierte Luziferaseaktivität des *P21CIP1*-Promotorfragmentes. Der Input-Immunoblot in **Abbildung 1.31B** zeigt das Ergebnis einer Western-Blot-Analyse von co-exprimiertem KL1 und Miz1 in HEK-293-Zellen. Überexprimiertes KL1 wurde mit anti-HA-Antikörper, Miz1 mit anti-Miz1-Antikörper detektiert. Der Nachweis von β-Tubulin diente als Ladekontrolle. Der Expressionsnachweis von Miz1 zeigt, dass der Verlust der Luziferaseaktivität nach Co-Expression von KL1 und Miz1 nicht dadurch verursacht worden war, dass die Miz1-Expression durch KL1 negativ reguliert wurde.

Um zu prüfen, ob KL1 an bestimmte Sequenzen des humanen *P21CIP1*-Promotors *in vitro* binden kann, wurde ein Oligonukleotid-Pulldown-Assay durchgeführt. Als Oligonukleotide dienten eine Sequenz aus der 3'UTR des *P21CIP1*-Promotors als Kontrolloligonukleotid, die Sequenz der Bindungsstelle für Miz1 (-32 bis +47 relativ zur *P21CIP1*-Transkriptionsstartstelle) (Wu S et al., 2003) sowie die der potenziellen Bindungsstelle für KL1 (**Abbildung 1.31A**). Diese potenzielle Bindungsstelle weist partielle Homologien zu einer von Daniel JM et al., 2002 beschriebenen DNA-Konsensussequenz (TCCTGCNA) für den Transkriptionsfaktor Kaiso auf, die auch von KL1 erkannt wird (Filion GJP et al., 2006). Am *P21CIP1*-Promotor befindet sie sich an den Positionen -195 (TCCTGC) und -165 (CCTGC) (Sequenzen des humanen *P21CIP1* Promotors von -200 bis -160: cc**tcctgc**agcacgcgaggtccgggaccggctgg**cctgct**).

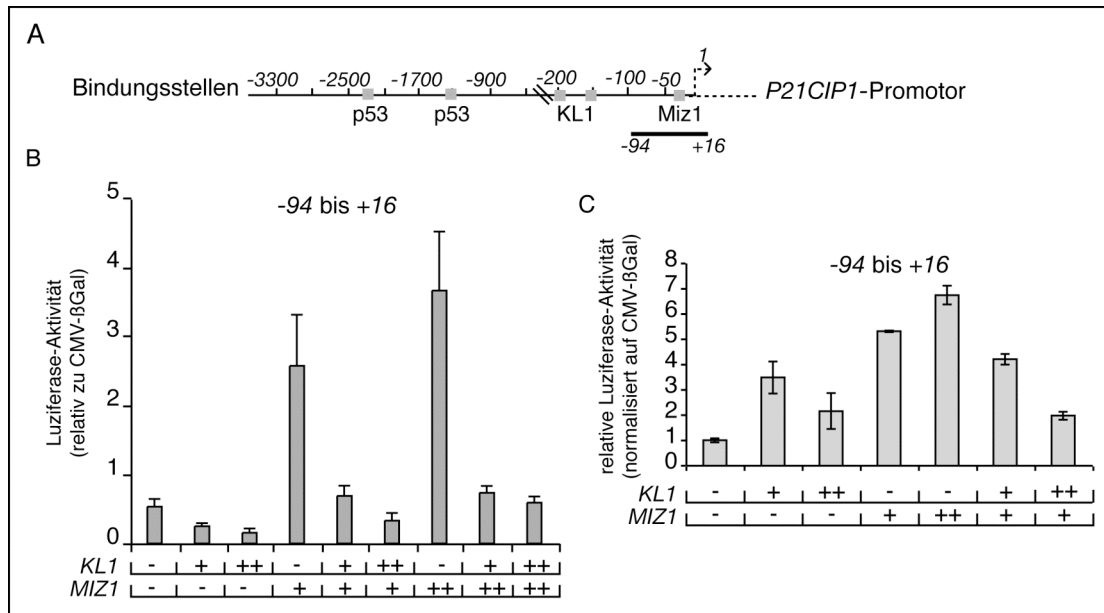


Abb. 1.30: P21CIP1-Reporter-Assay mit KL1 und Miz1

A: Skizze des humanen *P21CIP1*-Promotors mit Bindungsstellen der Transkriptionsfaktoren p53, Miz1 und KL1 sowie der eingezeichneten Länge des als Reporter verwendeten *P21CIP1*-Promotorfragmentes. B+C: *P21CIP1*-Reporter-Assay in SH-EP-Zellen, durchgeführt von Dr. Axel Weber (B), bzw. in HEK-293-Zellen (C). + entsprechen 5µg, ++ entsprechen 10µg an transfiziertem Expressionskonstrukt für KL1 bzw. Miz1. Die Luciferaseaktivität wurde auf βGal normalisiert. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung der Luciferaseaktivität (B) bzw. der relativen Luciferaseaktivität (C) an. Die Experimente wurden in Triplikaten durchgeführt.

Miz1 und KL1 wurden in HEK-293-Zellen einzeln sowie gemeinsam nach Transfektion der entsprechenden Konstrukte überexprimiert. Nach der Zelllyse wurde das jeweilige Zelllysate mit den aufgeführten Oligonukleotiden unter Zugabe von Zinkchlorid und Kompetitor-DNA inkubiert, bevor die überexprimierten Proteine in einem weiteren Schritt an Streptavidin-Beads gekoppelt und in der Western-Blot-Analyse auf Bindung an die entsprechenden Oligonukleotide hin überprüft wurden. Hierbei wurde KL1 mit dem anti-HA-Antikörper und Miz1 mit dem anti-Miz1-Antikörper (10E2) detektiert. Das Ergebnis ist in **Abbildung 1.31B** dargestellt. Der Input-Immunoblot (5% des Gesamtlysates) zeigt, dass die Proteine KL1 und Miz1 überexprimiert wurden. β-Tubulin diente als Ladekontrolle. Der Immunoblot des Pulldowns in **Abbildung 1.31C** zeigt, dass KL1 und Miz1 nicht mit dem Kontrolloligonukleotid, wohl aber mit dem Oligonukleotid der Bindungssequenz für Miz1 sowie mit dem Oligonukleotid der Bindungssequenz für KL1 interagierten. Die Bindung von Miz1 an beide Oligonukleotide wurde unter Co-Expression von KL1 verstärkt. Die Interaktion zwischen KL1 bzw. Miz1 mit den Oligonukleotiden ist spezifisch; der Nachweis von β-Tubulin zeigt, dass β-Tubulin keine Interaktion mit den Oligonukleotiden einging. Als Positivkontrolle für die Färbung des anti-β-Tubulin-Antikörpers diente ein Lysat

von HEK-293-Zellen. Mit diesem Experiment wurde nachgewiesen, dass KL1 *in vitro* an Sequenzen des *P21CIP1*-Promotors und dabei sowohl an die Bindungsstelle für KL1 als auch für Miz1 binden kann. Ebenso kann Miz1 nicht nur an die Bindungsstelle für Miz1, sondern auch an die für KL1 binden, verstärkt durch die Co-Expression von KL1, was auf eine Interaktion der beiden Proteine hindeutet.

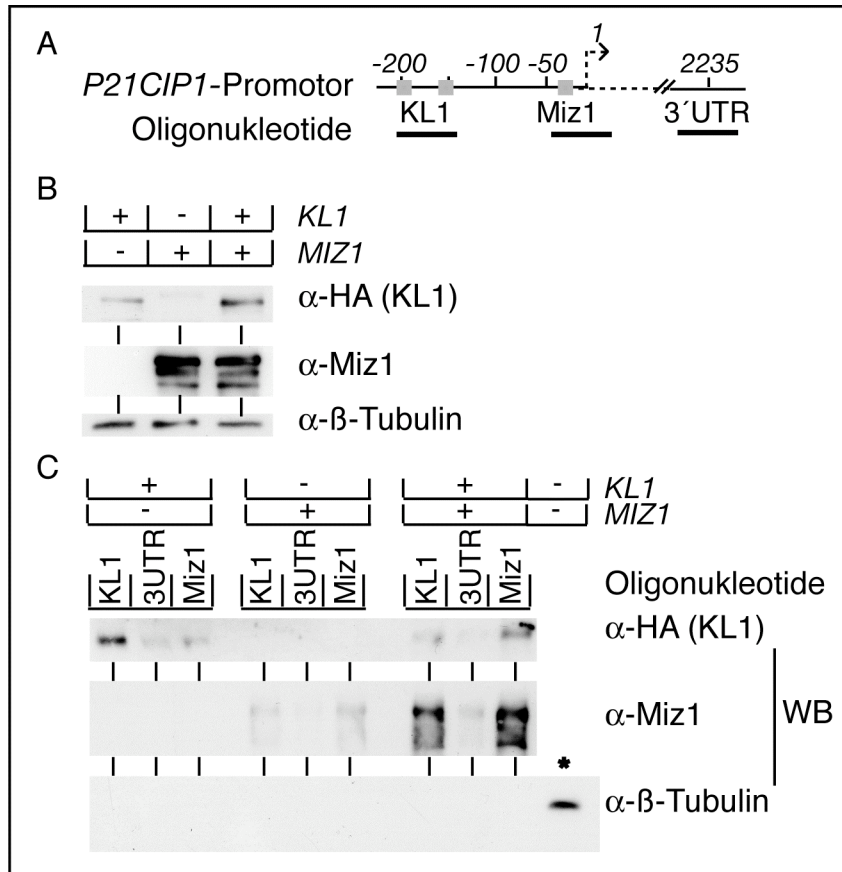


Abb. 1.31: Oligonukleotid-Pulldown von KL1 und Miz1 mit Bindungssequenzen des humanen *P21CIP1*-Promotors für KL1 und Miz1

A: Skizze des humanen *P21CIP1*-Promotors mit den Bindungsstellen der verwendeten Oligonukleotide. B: Der Immunoblot zeigt die Überexpression von KL1 und Miz1 in HEK-293-Zellen. Der Nachweis von β-Tubulin diene als Ladekontrolle. C: Der Immunoblot zeigt detektiertes KL1 und Miz1 nach Inkubation mit den KL1-, Miz1- und 3'UTR-Oligonukleotiden. Der Nachweis von β-Tubulin diene als Negativkontrolle (* HEK-293-Zelllysate als Positivkontrolle für die Färbung des anti-β-Tubulin-Antikörpers).

3.15 KL1 bindet an den *P21CIP1*-Promotor *in vivo*

Um zu zeigen, dass KL1 auch *in vivo* an den *P21CIP1*-Promotor binden kann, wurde eine Chromatin-Immunopräzipitations-Analyse durchgeführt. Als Zellsystem wurde der LS174T-Zellpool gewählt, welcher KL1 stabil schwach überexprimiert (s. **Abbildung 1.4**). Die Immunopräzipitation erfolgte mit dem anti-KL1-Antikörper (s. **3.17.1**) sowie mit einem Kontrollantikörper. Für die PCR wurden Primer verwendet, welche die Region am Kernpromotor (Miz1-Bindungsstelle) (-102 bis -22)

bzw. eine Kontrollregion (-2356 bis -2267) amplifizieren. Da die nach Ultraschallbehandlung erhaltenen DNA-Fragmente eine Größe von 100bp bis 500bp aufweisen, enthielt eine Vielzahl der mit den Primern des Kernpromotors amplifizierten DNA-Fragmente auch die KL1-Bindungsstelle. Die DNA vor (Input) und nach IP wurde mittels quantitativer Echtzeit-PCR analysiert und die amplifizierte DNA nach IP als prozentualer Anteil der amplifizierten Input-DNA dargestellt. Das Ergebnis zeigt **Abbildung 1.32**. Der nach IP mit dem anti-KL1-Antikörper mittels qPCR amplifizierte DNA-Anteil des Kernpromotors betrug 0,027% der zu Beginn des Experimentes eingesetzten DNA-Menge des Kernpromotors. Diese Bindung war spezifisch, denn nach IP mit dem anti-KL1-Antikörper wurde 4,5fach mehr DNA des Kernpromotors amplifiziert als DNA der Kontrollregion und als DNA des Kernpromotors nach IP mit einem Kontrollantikörper. Somit wurde gezeigt, dass KL1 auch *in vivo* an den *P21CIP1*-Promotor bindet.

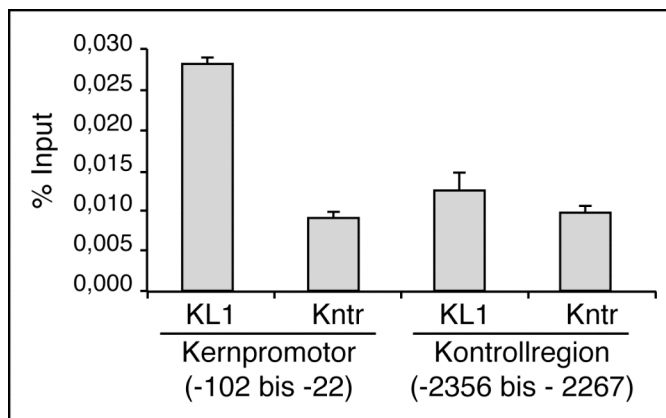


Abb. 1.32: KL1 bindet an den *P21CIP1*-Promotor *in vivo*

Grafische Auswertung einer ChIP-Analyse des *P21CIP1*-Promotors in KL1 überexprimierenden LS174T-Zellen. Die IP erfolgte mit KL1- und Kontroll-Antikörper. In der in Triplikaten durchgeführten quantitativen Echtzeit-PCR-Analyse wurde die Region am Kernpromotor (-102 bis -22; enthält Miz1-Bindungsstelle) sowie eine Kontrollregion (-2356 bis -2267) des *P21CIP1*-Genlokus vor (Input) und nach der IP mit sequenzspezifischen Primern amplifiziert. Die amplifizierte DNA nach der IP wurde als prozentualer Anteil der amplifizierten Input-DNA dargestellt. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.

3.16 Die Repression der Transaktivierung von *P21CIP1* durch KL1 ist abhängig von der Histondeacetylase-Aktivität

Die Transaktivierung des *P21CIP1*-Promotors kann durch die Rekrutierung von Histondeacetylase inhiert werden (Lagger G et al., 2002; Lagger G et al., 2003). Dass KL1 mit HDACs interagieren kann, wurde bereits gezeigt (**Abschnitt 3.5**). Im Folgenden wurde untersucht, ob die Rekrutierung von HDACs auch für die KL1 vermittelte Repression der *P21CIP1*-Expression notwendig ist.

Exponentiell wachsende SH-EP-Zellen, die KL1 stabil überexprimieren (KL1), sowie Kontrollzellen (LV) wurden für 12h mit den HDAC-Inhibitoren Trichostatin A (TSA, 50ng/ml) und Natriumbutyrat (5mM) bzw. Lösungsmittel behandelt. Die Zellen wurden in einer quantitativen Echtzeit-PCR-Analyse auf die mRNA-Expression von *P21CIP1* untersucht. Als interner Standard diente $\beta 2$ -MIKROGLOBULIN. Die relative *P21CIP1*-mRNA-Expression der Kontroll- und der KL1 überexprimierenden SH-EP-Zellen wurde ermittelt. Anschließend wurde der Quotient dieser relativen Expression aus Kontrollzellen und KL1 überexprimierenden Zellen für jede Bedingung berechnet, um die relative Repression der *P21CIP1*-mRNA-Expression durch KL1 zu bestimmen. Das Ergebnis ist grafisch in **Abbildung 1.33A** dargestellt. Die mRNA-Expression von *P21CIP1* wurde in Zellen mit KL1-Überexpression um das 30fache unter Normalbedingungen, nach Zugabe von TSA um das 7fache und unter Zugabe von Natriumbutyrat um das 4fache im Vergleich zu den Kontrollzellen reprimiert. **Abbildung 1.33B** zeigt die relative mRNA-Expression von *KL1* in Kontrollzellen und in SH-EP-Zellen mit stabiler KL1-Überexpression unter den unterschiedlichen Behandlungsbedingungen; die mRNA-Expression von *KL1* veränderte sich nicht signifikant. Mit diesem Experiment wurde gezeigt, dass die Histondeacetylase-Aktivität zu der KL1 vermittelten Repression der *P21CIP1*-Expression beiträgt.

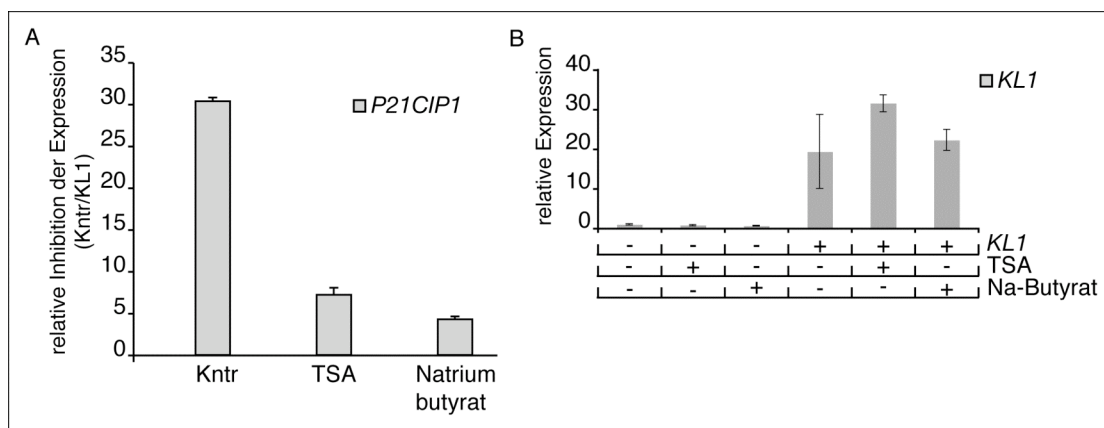


Abb. 1.33: Hemmung der HDAC-Aktivität führt zu verminderter Repression der *P21CIP1*-Expression durch KL1

Grafische Auswertung der in Triplikaten durchgeführten quantitativen Echtzeit-PCR-Analyse von KL1 stabil überexprimierenden SH-EP-Zellen und Kontrollzellen nach Behandlung mit 50ng/ml Trichostatin A (TSA) oder 5mM Natriumbutyrat bzw. Lösungsmittelkontrolle für 12h. Als interner Standard diente die Expression von $\beta 2$ -MIKROGLOBULIN. A: Dargestellt ist die relative Inhibition der *P21CIP1*-Expression in KL1 überexprimierenden SH-EP-Zellen versus Kontrollzellen. B: Gezeigt wird die relative mRNA-Expression von *KL1* unter den jeweiligen Behandlungsbedingungen in Kontrollzellen sowie SH-EP-Zellen, die KL1 stabil überexprimieren. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.

3.17 Interaktionsstudie von KL1 und Miz1

3.17.1 KL1-Antikörper

Die Arbeitsgruppe von Dr. Pierre-Antoine Defossez, Paris, hatte in der Zwischenzeit einen Antikörper gegen KL1 entwickelt und uns zur Verfügung gestellt (Filion GJP et al., 2006). Dieser wurde in der Western-Blot-Analyse getestet (**Abbildung 1.34A**). Der anti-KL1-Antikörper detektierte überexprimiertes KL1-Protein in SH-EP-Zellen, die KL1 nach Infektion mit dem Konstrukt pBabe-puro-3HAKL1 stabil überexprimieren, sowie endogenes KL1 in Kontrollzellen. Die Banden waren spezifisch; nach der Inkubation mit Präimmunserum wurden auf dem Immunoblot keine Banden nachgewiesen. Der Nachweis von Cdk2 diente als Ladekontrolle. Die Detektion von exogenem KL1-Protein mit dem anti-KL1-Antikörper war konsistent, die Detektion von endogenem KL1 gelang nicht immer (Daten nicht gezeigt). Der anti-KL1-Antikörper wurde ebenfalls in der Immunopräzipitationsanalyse getestet: HEK-293-Zellen wurden mit pCMV-Expressionsvektor für KL1 bzw. mit leerem Vektor (LV) transfiziert. Die IP erfolgte mit anti-HA-Antikörper, anti-KL1-Antikörper und Kontrollantikörper. Die Western-Blot-Analyse erfolgte mit anti-HA-Antikörper und anti-KL1-Antikörper. Das Ergebnis ist in **Abbildung 1.34B** dargestellt. Nach IP des überexprimierten KL1-Proteins mit anti-HA-Antikörper konnten der anti-HA-Antikörper und der anti-KL1-Antikörper dieses detektieren. Mit dem anti-KL1-Antikörper immunopräzipitiertes KL1-Protein wurde in der Western-Blot-Analyse von dem anti-HA-Antikörper erkannt. Mit dem anti-KL1-Antikörper konnte es nicht nachgewiesen werden. Hier war die Hintergrundfärbung zu stark. Zudem zeigte der anti-KL1-Antikörper Hintergrundfärbung nach IP mit einem Kontrollantikörper. Aus diesem Grund wurde der anti-KL1-Antikörper nur in der IP, nicht aber in der Western-Blot-Analyse nach IP eingesetzt. Da HEK-293-Zellen nur schwach *KL1*-mRNA exprimieren (Daten nicht gezeigt), kann dies ein Grund sein, weshalb das endogene Protein mit dem anti-KL1-Antikörper in dem Input-Immunoblot nur sehr schwach detektiert wurde.

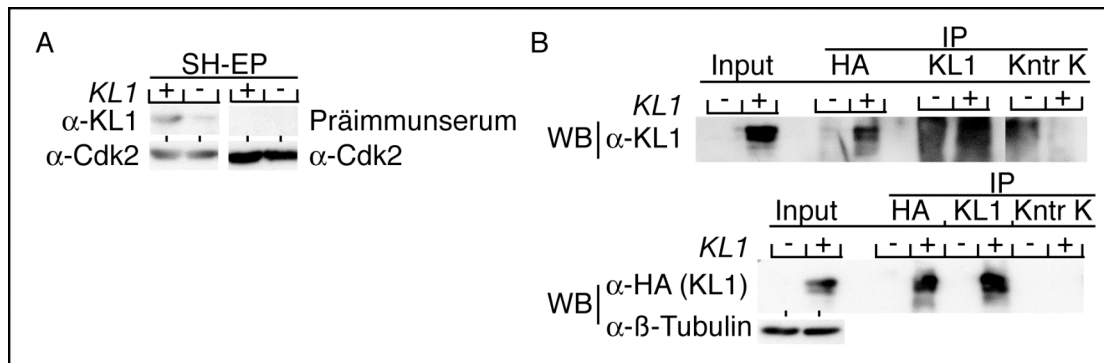


Abb. 1.34: Test des anti-KL1-Antikörpers

A: Der Immunoblot zeigt die Detektion von exogenem und endogenem KL1-Protein mit anti-KL1-Antikörper in SH-EP-Zellen. Die Zellen waren zuvor stabil mit den Konstrukten pBabe-puro-3HAKL1 (+) bzw. Kontrollkonstrukt (-) infiziert worden. Die Inkubation mit Präimmunserum diente als Kontrolle für die Bandenspezifität, die Detektion von Cdk2 als Ladekontrolle. B: Immunoblot nach IP von KL1 in HEK-293-Zellen, die mit pCMV-Expressionskonstrukten für KL1 (+) bzw. LV (-) transfiziert worden waren. Die IP erfolgte mit anti-HA- und anti-KL1-Antikörper sowie mit anti-Kaninchen-Antikörper als Kontrolle (Kntr K). Anti-HA- und anti-KL1-Antikörper wurden für den Immunoblot eingesetzt. β -Tubulin diente als Ladekontrolle des Input-Immunoblots.

3.17.2 Exogener Interaktionsnachweis zwischen KL1 und Miz1

Da in den vorhergehenden Experimenten gezeigt wurde, dass KL1 die Miz1 vermittelte Transaktivierung der *P21CIP1*-Expression hemmt, beide Proteine an die Bindungssequenzen am *P21CIP1*-Promotor des jeweils anderen Proteins *in vitro* binden und KL1 am Kernpromotor *in vivo* bindet, an dem sich auch die Miz1-Bindungsstelle befindet, wurde als Nächstes untersucht, ob Miz1 und KL1 miteinander interagieren können.

HEK-293-Zellen wurden mit den Expressionskonstrukten für Miz1 (pUHD-MIZ1) und KL1 bzw. LV co-transfiziert. Miz1 wurde mit dem anti-Miz1-Antikörper H190 immunopräzipitiert. In der Western-Blot-Analyse wurde Miz1 mit dem anti-Miz1-Antikörper 10E2 detektiert. Mit dem anti-HA-Antikörper wurde die Co-Immunopräzipitation von Miz1 mit KL1 nachgewiesen. KL1 wurde mit dem KL1-Antikörper immunopräzipitiert. In der Western-Blot-Analyse wurde KL1 mit dem anti-HA-Antikörper detektiert. Mit dem anti-Miz1-Antikörper 10E2 wurde die Co-Immunopräzipitation von KL1 mit Miz1 nachgewiesen. Die Bindungsspezifität zwischen den genannten Antikörpern und Proteinen während der Immunopräzipitation wurde durch den Einsatz eines Kontrollantikörpers als Negativkontrolle bestätigt. Das Ergebnis des Experiments ist in **Abbildung 1.35** dargestellt. Die Proteine Miz1 und KL1 konnten co-immunopräzipitiert werden. Nach IP mit dem Kontrollantikörper konnten kein Miz1 und kein KL1 im Immunoblot detektiert werden. Nach längerer Belichtungszeit konnte eine schwache Miz1-Bande in den mit LV- und Miz1-Konstrukt transfizierten

Zellen nach IP mit dem anti-KL1-Antikörper in der Western-Blot-Analyse detektiert werden, ein Hinweis auf eine endogene Interaktion. Die Überexpression von KL1 und Miz1 wurde im Input-Immunoblot nachgewiesen.

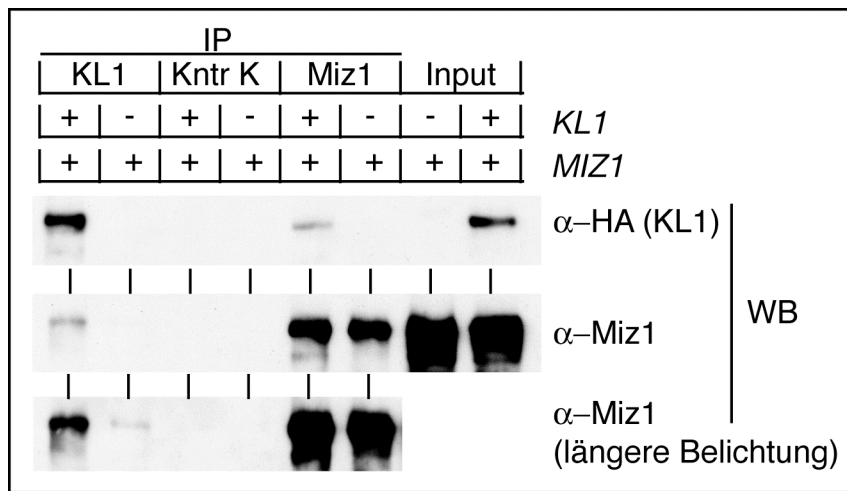


Abb. 1.35: Interaktion zwischen KL1 und Miz1

Der Immunoblot zeigt das Ergebnis der Co-IP von überexprimiertem KL1 und Miz1 in HEK-293-Zellen. Die IP erfolgte mit anti-HA-Antikörper (KL1), anti-Miz1-Antikörper (H190) und Kontrollantikörper (K: Kaninchen). Die Western-Blot-Analyse erfolgte mit anti-HA-Antikörper und anti-Miz1-Antikörper (10E2). (-) Transfektion des jeweiligen LV-Konstruktes.

3.17.3 KL1 und Miz1 interagieren auch unter Ethidiumbromid

Der Aufschluss der Zellen für die Immunopräzipitation erfolgte unter Niedrigsalzbedingungen (150mM NaCl) mit einem anschließenden Sonifizierungsschritt. Um auszuschließen, dass KL1 und Miz1 nur deshalb co-immunopräzipitiert werden konnten, weil sie nebeneinander an der DNA binden, wurde das Zelllysate, welches überexprimiertes KL1 und Miz1 enthielt, vor Zugabe der Antikörper für die Immunopräzipitation mit 0,1mg/ml Ethidiumbromid für 10 Min bei 4°C inkubiert. Ethidiumbromid interkaliert die DNA. Dies führt zu dessen Entwindung, so dass Proteine, die nicht miteinander interagieren und nur nebeneinander an der DNA gebunden haben, räumlich voneinander getrennt werden. Alle weiteren Schritte erfolgten wie beschrieben (s.o.), wobei für die Co-IP ein anti-HA- und ein anti-Miz1-Antikörper eingesetzt wurden. Das Ergebnis ist in **Abbildung 1.36** dargestellt. Auch nach Behandlung mit Ethidiumbromid konnten Miz1 und KL1 co-immunopräzipitiert werden. Nach IP mit Kontrollantikörpern konnten weder Miz1- noch KL1-Protein in der Western-Blot-Analyse detektiert werden. Der Input-Immunoblot zeigt die Überexpression von Miz1 und KL1.

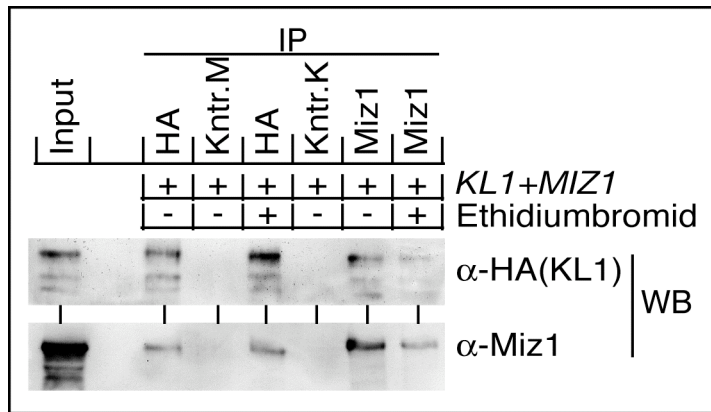


Abb. 1.36: KL1 und Miz1 interagieren auch unter der Zugabe von Ethidiumbromid miteinander
 Der Immunoblot zeigt das Ergebnis der Co-IP von co-exprimierten KL1 und Miz1 in HEK-293-Zellen nach der Behandlung mit Ethidiumbromid. Vor Zugabe der Antikörper für die IP wurden die Lysate mit Ethidiumbromid inkubiert. Die IP erfolgte mit anti-HA-, anti-Miz1(H190)- und Kontroll-Antikörpern (M: Maus, K: Kaninchen). Die Western-Blot-Analyse erfolgte mit anti-HA- und anti-Miz1(10E2)-Antikörper. Der Input-Immunoblot zeigt die Proteinexpression von Miz1 und KL1.

3.17.4 KL1 interagiert mit endogenem Miz1

Die Untersuchung der Interaktion von KL1 mit endogenem Miz1 erfolgte in LS174T-Zellen, die KL1 nach Infektion mit dem Expressionsvektor pBabe-puro-3HAKL1 stabil überexprimieren. Die Expression von exogenem KL1-Protein ist in diesen Zellen sehr schwach (**s. Abbildung 1.4A**). Gleichzeitig exprimieren LS174T-Zellen im Vergleich zu anderen Zelllinien gut detektierbare Mengen an endogenem Miz1-Protein (**Input Abbildung 1.37**). Die Zelllyse erfolgte mit einem Hochsalzpuffer (500mM NaCl), die Immunopräzipitation mit anti-KL1-Antikörper, mit anti-Miz1-Antikörper (H190) und mit Kontrollantikörper. Die Western-Blot-Analyse erfolgte mit anti-Miz1-Antikörper (10E2). Das Ergebnis ist in **Abbildung 1.37** dargestellt. Endogenes Miz1 konnte mit anti-KL1-Antikörper, nicht aber mit Kontrollantikörper co-immunopräzipitiert werden. Demnach interagiert KL1 auch mit endogenem Miz1.

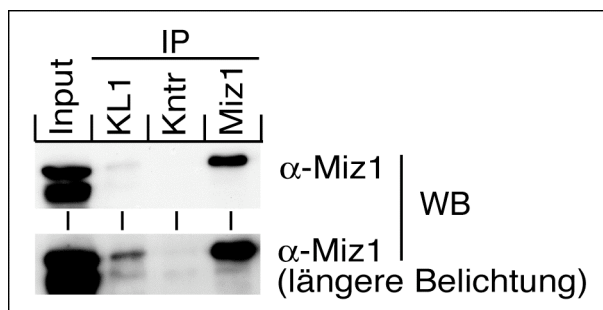


Abb. 1.37: Interaktion von KL1 mit endogenem Miz1

Der Immunoblot zeigt das Ergebnis der Co-IP von KL1 und endogenem Miz1 in LS174T-Zellen, die exogenes KL1 schwach exprimieren. Die IP erfolgte mit Miz1-, KL1- und Kontroll-Antikörper, die Western-Blot-Analyse mit Miz1-Antikörper.

3.17.5 Die POZ-Domäne von Miz1 ist für die Interaktion mit KL1 nicht essentiell

Um die Interaktionsdomänen zu identifizieren, welche die Bindung zwischen KL1 und Miz1 vermitteln, wurde eine Co-Immunopräzipitation mit KL1 und der

deltaPOZ-Mutante von Miz1 durchgeführt. Diese Mutante wurde gewählt, weil POZ-Domänen als Protein-Protein-Interaktionsdomänen agieren können (Bardwell VJ und Treisman R, 1994). Die Expressionskonstrukte für KL1 bzw. LV sowie für die Miz1*deltaPOZ*-Mutante (pUHD-MIZ1*deltaPOZ*) wurden in HEK-293-Zellen co-transfiziert und mittels Co-Immunopräzipitation auf Interaktion untersucht. Die IP erfolgte mit anti-HA-, anti-Miz1 (H190)-Antikörpern sowie Kontrollantikörpern, die Western-Blot-Analyse mit anti-HA- und anti-Miz1 (10E2)-Antikörpern. Das Ergebnis ist in **Abbildung 1.38** dargestellt. KL1 und die Miz1*deltaPOZ*-Mutante konnten sowohl nach IP mit dem anti-HA-Antikörper als auch nach IP mit dem anti-Miz1-Antikörper co-immunopräzipitiert werden, nicht aber mit den Kontrollantikörpern. Nach IP mit dem anti-HA-Antikörper konnte in den Zellen, die mit den Expressionskonstrukten für Miz1*deltaPOZ* und LV co-transfiziert worden waren, keine Bande mit dem anti-Miz1-Antikörper in dem Immunoblot nachgewiesen werden. Eine Interaktion zwischen dem Haemagglutinin-Anhang des exogenen KL1-Proteins und dem anti-Miz1-Antikörper während der IP wurde damit ausgeschlossen. Im Input-Immunoblot ist die Überexpression von KL1 und Miz1*deltaPOZ* zu sehen. β -Tubulin diene als Ladekontrolle. Das Ergebnis der Co-IP zeigt, dass die POZ-Domäne von Miz1 für die Interaktion zwischen KL1 und Miz1 nicht notwendig ist.

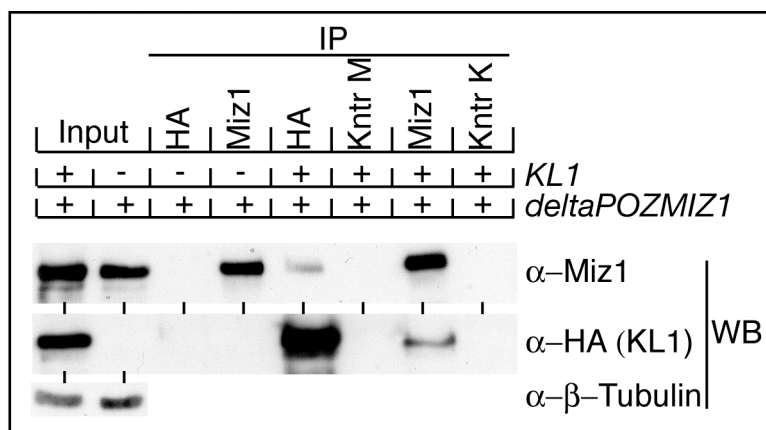


Abb. 1.38: KL1 interagiert auch mit der Miz1-Mutante Miz1*deltaPOZ*

Der Input-Immunoblot zeigt die Überexpression von KL1 und der Miz1*deltaPOZ*-Mutante. β -Tubulin diene als Ladekontrolle. Der Immunoblot zeigt das Ergebnis der Co-IP von KL1 und der Mutante Miz1*deltaPOZ* in HEK-293-Zellen. Die IP erfolgte mit anti-Miz1(H190)-, anti-HA- und Kontroll-Antikörpern (M: Maus, K: Kaninchen), die Western-Blot-Analyse mit Miz1(10E2)- und HA-Antikörper.

3.18 KL1 interagiert mit Miz1 und HDAC2 bzw. HDAC6

Unter 3.5 wurde beschrieben, dass KL1 mit den Histondeacetylasen HDAC2 bzw. HDAC6, unter 3.17, dass KL1 mit Miz1 interagieren kann. Im Folgenden wurde untersucht, ob alle drei Proteine miteinander interagieren können.

Hierzu wurden zum einen die Expressionskonstrukte für KL1, Miz1 und HDAC2 und zum anderen für KL1, Miz1 und HDAC6 in HEK-293-Zellen co-transfiziert. Die Immunopräzipitation erfolgte mit anti-HA-Antikörper (KL1), anti-Miz1-Antikörper (H190) und Kontrollantikörpern. In der Western-Blot-Analyse wurde KL1 mit anti-HA-Antikörper, Miz1 mit anti-Miz1-Antikörper (10E2) und HDAC2 bzw. HDAC6 mit anti-His-Antikörper detektiert. Das Ergebnis ist in **Abbildung 1.39** dargestellt. Die Überexpression der zu untersuchenden Proteine zeigt der Input-Immunoblot. Miz1, HDAC2 und HDAC6 wurden mit KL1 co-immunopräzipitiert (anti-HA-Antikörper). KL1, HDAC2 und HDAC6 wurden mit Miz1 co-immunopräzipitiert (anti-Miz1-Antikörper). HDAC2 schien stärker an KL1 als an Miz1 zu binden. Die Proteine interagierten in der IP nicht mit den Kontrollantikörpern. Das Ergebnis zeigt, dass in dem Dreierkomplex aus KL1, Miz1 und HDAC2 bzw. HDAC6 sowohl KL1 als auch Miz1 mit HDAC2 bzw. HDAC6 interagieren können.

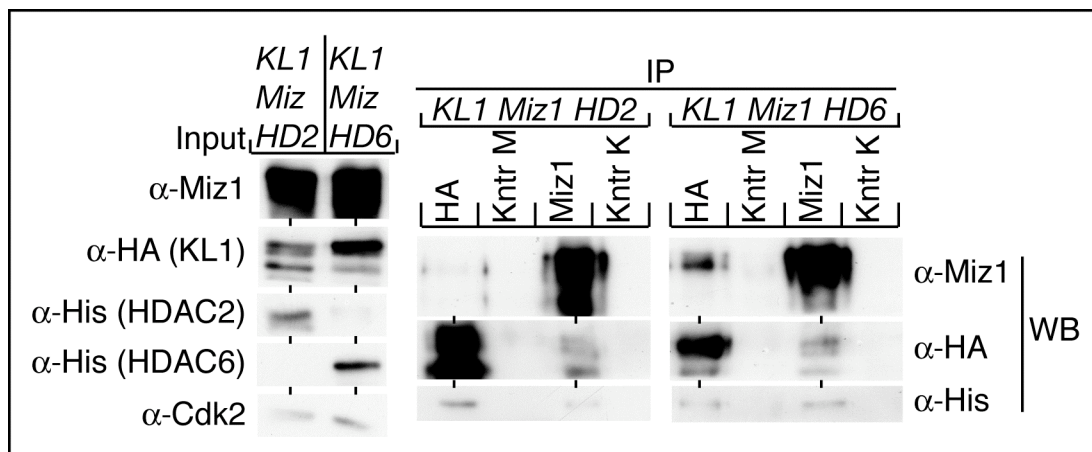


Abb. 1.39: Interaktion zwischen KL1, Miz1, HDAC2 bzw. HDAC6

Der Immunoblot zeigt das Ergebnis der Co-IP von exogenem KL1, Miz1 und HDAC2 (HD2) bzw. HDAC6 (HD6) in HEK-293-Zellen. Die IP erfolgte mit Miz1-, HA- und Kontroll-Antikörpern (M: Maus, K: Kaninchen), die Western-Blot-Analyse mit Miz1-, HA- (KL1) und His- (HDAC2 und HDAC6) Antikörpern. Der Input-Immunoblot zeigt die Überexpression der untersuchten Proteine. Der Nachweis von Cdk2 diente als Ladekontrolle.

3.19 KL1 interagiert mit Miz1 und Myc

Miz1 wurde als Myc interagierendes Protein entdeckt (Peukert K et al., 1997). Da Miz1 und KL1 interagieren können, wurde im Folgenden überprüft, ob KL1 auch mit Myc, ebenfalls ein Repressor der *P21CIP1*-Expression (Herold S et al., 2002) interagieren kann und ob diese Interaktion abhängig von Miz1 ist.

HEK-293-Zellen wurden zum einen mit den Expressionskonstrukten für KL1, Miz1 und MycWT (Wildtyp) (pcDNA3-MYCWT) und zum anderen mit denen für KL1, Miz1 und MycVD (pcDNA3-MYCV) transfiziert. (MycVD enthält eine Punktmutat-

tion, durch welche es nicht mehr an Miz1 binden kann (Herold S et al., 2002)). Der Input-Immunoblot zeigt die Überexpression der Proteine (**Abbildung 1.40A**). Die Immunopräzipitationen erfolgten mit den Antikörpern anti-HA (KL1), anti-KL1, anti-Miz1 (H190), anti-Myc (N262) sowie mit Kontrollantikörpern. Die Western-Blot-Analyse erfolgte mit den Antikörpern anti-HA (KL1), anti-Miz1 (10E2) und anti-Myc (9E10). Nach Co-Expression mit MycWT konnten sowohl Miz1 als auch KL1 mit dem anti-Myc-Antikörper co-immunopräzipitiert werden und MycWT mit den anti-HA-, anti-KL1- und anti-Miz1-Antikörpern (**Abbildung 1.40B**). Co-exprimiertes MycVD konnte nicht mit KL1 und Miz1 co-immunopräzipitiert werden (**Abbildung 1.40C**). Das Ergebnis zeigt, dass KL1 und Myc miteinander interagieren können und dass diese Interaktion dadurch vermittelt wird, dass beide Proteine an Miz1 binden.

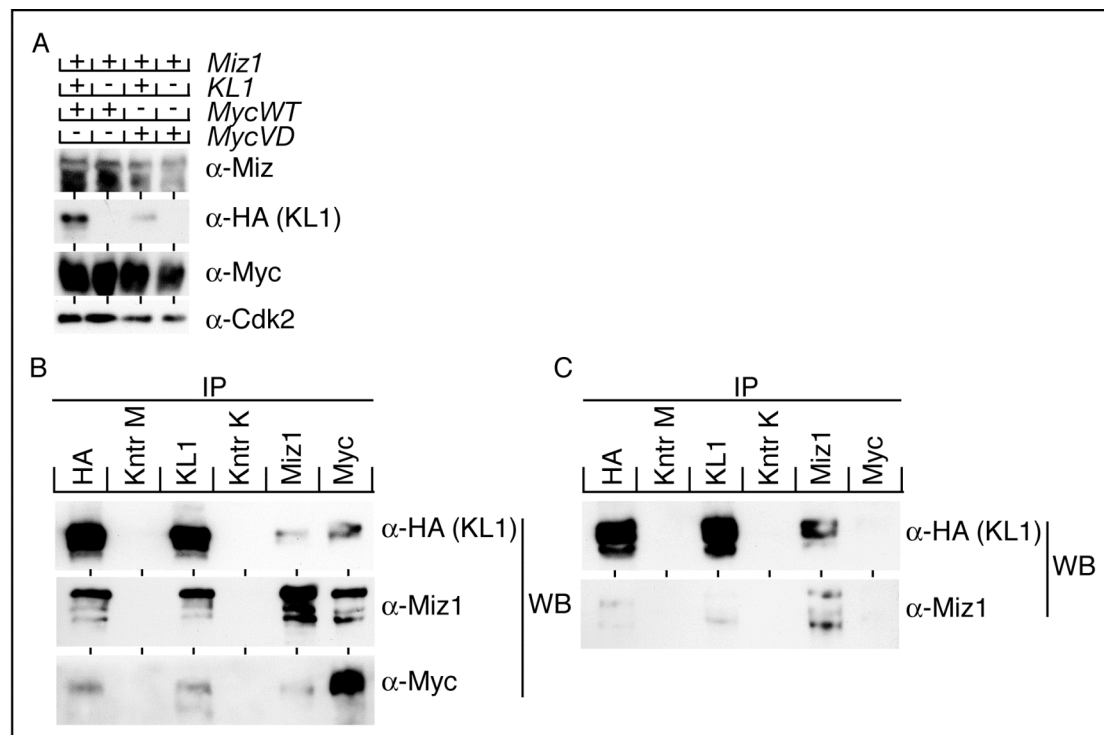


Abb. 1.40: Interaktion zwischen KL1, Miz1 und MycWT, nicht aber MycVD

A: Input-Immunoblot der überexprimierten Proteine. B+C: Die Immunoblots zeigen das Ergebnis der Co-IP von exogenem KL1, Miz1 und MycWT (B) bzw. MycVD (C) in HEK-293-Zellen. Cdk2 diente als Ladekontrolle. Die IP erfolgte mit Antikörpern gegen Miz1, HA (KL1), KL1, Myc und Kontrolle (M: Maus, K: Kaninchen), die Western-Blot-Analyse mit Antikörpern gegen Miz1, HA (KL1) und Myc (B) und gegen Miz1 sowie HA (KL1) (C). Der Myc-Immunoblot wurde mit True Blot-Sekundärantikörper entwickelt.

3.20 Suche nach weiteren KL1-Zielgenen mittels Microarray-Analyse

Um weitere durch KL1 regulierte Gene zu finden, wurden die mit Nutlin-3 bzw. DMSO für 33h behandelten SH-EP-Zellen mit und ohne KL1-Überexpression in einer Microarray-Analyse auf ihr Genexpressionsprofil untersucht. Die Analyse wurde von

der Service-Einheit Microarray des IMT, die statistische Auswertung von Dr. Birgit Samans, IMT, durchgeführt. Auch in diesem Microarray wurde *P21CIP1* als ein reprimiertes Gen von KL1 bestätigt. Neben *P21CIP1* unterschied sich die Genexpression von *TRIM58* und *WNT5B* in Zellen, die KL1 überexprimieren, von den Kontrollzellen unabhängig von der Nutlinbehandlung. *TRIM58* ist ein Gen mit bisher unbekannter Funktion und *WNT5B* ein Gen, das im nicht-kanonischen Wnt-Signalweg involviert ist (Katoh M, 2005). Im Gegensatz zu *P21CIP1* waren deren Transkripte in Zellen mit KL1-Überexpression hochreguliert (**Abbildung 1.41A**). Das Ergebnis wurde mittels quantitativer Echtzeit-PCR-Analyse bestätigt (**Abbildung 1.41B**). Zur Gesamtauswertung des Microarrays s. Anhang Microarray-Listen.

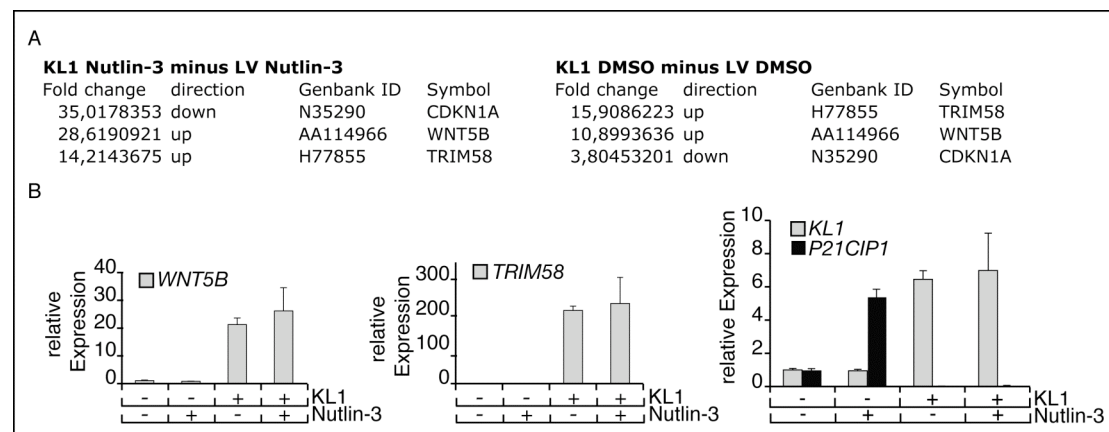


Abb. 1.41: Die Expression von *WNT5B* und *TRIM58* ist in KL1 überexprimierenden Zellen erhöht

A: Ergebnisausschnitt einer Microarray-Analyse von KL1 überexprimierenden und Kontrollzellen. Gezeigt wird die Veränderung der mRNA-Expression von *P21CIP1* (*CDKN1A*), *WNT5B* und *TRIM58* in KL1 überexprimierenden Zellen gegenüber Kontrollzellen unter Nutlinbehandlung (4µM, 33h) (links) und unter DMSO-Kontrollbehandlung (rechts) (fold change: x-fache Expressionsänderung). B: Validierung der Expressionsergebnisse aus der Microarray-Analyse für die Gene *WNT5B*, *TRIM58* und *P21CIP1*. Als Referenzgen diente β 2-MIKROGLOBULIN. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung der relativen Expression an. Die quantitative Echtzeit-PCR wurde in Triplikaten durchgeführt.

4. DISKUSSION

Die Aufgabenstellung der vorliegenden Doktorarbeit war, das bis *dato* unbekannte Protein Kaiso Like 1 (KL1) näher zu charakterisieren, hierbei Interaktionspartner und Zielgene sowie eine mögliche biologische Funktion zu identifizieren.

Im Rahmen dieser Aufgabenstellung wurden drei wichtige Ergebnisse erzielt:

Erstens wurde der Transkriptionsfaktor Miz1 und die Histondeacetylasen HDAC2 und HDAC6 als Interaktionspartner von KL1 entdeckt. Zweitens wurde *P21CIP1* als ein reprimiertes Zielgen von KL1 identifiziert. Und drittens wurde die Modulation der p53-Antwort als eine biologische Funktion von KL1 gefunden. Alle weiteren Beobachtungen ergänzen diese zentralen Ergebnisse.

4.1 Kaiso Like 1 – neuer Interaktionspartner von Miz1

Kaiso Like 1 (KL1) gehört zur Familie der POZ-Zinkfinger-Proteine, wie auch Bcl-6 und Miz1. Bcl-6 war das erste POZ-Zinkfinger-Protein, das als Interaktionspartner von Miz1 identifiziert wurde (Phan RT et al., 2006). In der vorliegenden Arbeit wurde KL1 als zweites POZ-Zinkfinger-Protein nachgewiesen, welches mit Miz1 interagiert. Co-Immunopräzipitations-Analysen haben ergeben, dass exogenes KL1 und Miz1 interagieren (**s. Abb. 1.35**). Für die Zelllyse wurden 150mM NaCl eingesetzt und die Zellen sonifiziert. Diese „sanfte“ Aufreinigungsmethode kann falsch positive Interaktionsergebnisse von Proteinen verursachen, wenn diese unabhängig voneinander nebeneinander an die DNA binden, ohne miteinander zu interagieren, und durch die beschriebene Behandlung nicht räumlich voneinander getrennt werden. Die Zugabe von Ethidiumbromid vor der Immunopräzipitation reduziert diese falsch positiven Ergebnisse, da Ethidiumbromid die DNA interkaliert und hierdurch entwindet. Proteine, die nicht miteinander interagieren, werden auf diese Weise räumlich voneinander getrennt. Der exogene Interaktionsnachweis von KL1 und Miz1 gelang auch unter der Zugabe von Ethidiumbromid und bestätigt damit die Ergebnisse der vorhergehenden Experimente (**s. Abb. 1.36**).

Einen Hinweis auf eine endogene Interaktion lieferte eine Co-Immunopräzipitations-Analyse von überexprimiertem KL1 und Miz1 in Hek293-Zellen, die mit einem KL1- und einem Miz1-Antikörper durchgeführt wurde. Hier konnte auch in den mit Miz1-Konstrukt und leerem Vektor transfizierten Zellen nach Immunopräzipitation mit dem KL1-Antikörper im Immunoblot eine Bande für Miz1 nachgewiesen werden (**s. Abb.**

1.35). Um eine Interaktion mit endogenem Miz1 zu untersuchen, wurden LS174T-Zellen gewählt, die endogene *KL1*-mRNA exprimieren und nach stabiler Infektion mit dem KL1-Konstrukt exogenes KL1-Protein schwach überexprimieren (**s. Abb. 1.4**). Auf eine KL1-Überexpression musste ausgewichen werden, da die Detektion von endogenem KL1-Protein mit dem zur Verfügung stehenden KL1-Antikörper in der Western-Blot-Analyse inkonsistent war und auch nicht nach vorheriger Immunopräzipitation mit dem KL1-Antikörper gelang; hier war die Hintergrundfärbung zu hoch. Jedoch detektierte der Antikörper überexprimiertes KL1 in der Western-Blot-Analyse und band KL1-Protein während der Immunopräzipitation. Zudem exprimieren LS174T-Zellen relativ hohe Mengen an Miz1-Protein. Die Zelllyse erfolgte mit einem Hochsalzpuffer (500mM NaCl), um Proteine aus dem Zellkern zu isolieren. Grund hierfür war, dass Miz1 im Zellkern lokalisiert ist und eigene Daten (Immunofluoreszenz, Kernextraktion, native Chromatinisolierung) gezeigt haben, dass auch KL1 ein nukleäres Protein ist (**s. Abb. 1.7 bis Abb. 1.9**). Unter Verwendung des KL1-Antikörpers für die Immunopräzipitation und des Miz1-Antikörpers für die Western-Blot-Analyse wurde nachgewiesen, dass KL1 auch mit endogenem Miz1 interagiert (**s. Abb. 1.37**).

Diese Co-Immunopräzipitations-Analysen zeigen, dass KL1 und Miz1 *in vivo* interagieren. Offen bleibt, ob die Bindung direkt oder indirekt erfolgt. Dies könnte in einer Folgearbeit beispielsweise mit einer In-vitro-Interaktionsstudie mit Hilfe eines Pull-down-Experimentes geklärt werden. Wird eine direkte Interaktion zwischen Miz1 und KL1 nachgewiesen, können in weiteren In-vitro- und In-vivo-Experimenten Expressionsmutanten eingesetzt werden, um die genauen Interaktionsdomänen zu identifizieren. In dieser Arbeit wurde bereits mittels einer Co-Immunopräzipitations-Analyse untersucht, ob die POZ-Domäne von Miz1 für die Interaktion mit KL1 essentiell ist, da POZ-Domänen als Protein-Protein-Interaktionsdomänen agieren können. Zwischen exogenem KL1 und einer Miz1 Δ POZ-Mutante konnte allerdings weiterhin eine Interaktion nachgewiesen werden (**s. Abb. 1.38**). Die POZ-Domäne von Miz1 ist demnach nicht essentiell für die Interaktion mit KL1.

Biologisch wichtig ist die in dieser Arbeit gefundene Interaktion mit Miz1 vermutlich für die KL1 vermittelte Repression der *P21CIP1*-Expression, die im Folgenden diskutiert wird.

4.2 Kaiso Like 1 – transkriptioneller Repressor der *P21CIP1*-Expression

In dieser Arbeit wurde in mehreren Zelllinien zum einen durch Überexpression von KL1, zum anderen durch Depletion von KL1 nachgewiesen, dass KL1 die Transaktivierung der *P21CIP1*-Genexpression reprimiert. Zellen, die KL1 überexprimieren, zeigen im Vergleich zu Kontrollzellen eine niedrigere Expression von *P21CIP1*, solche, in denen die KL1-Expression herunterreguliert ist, eine erhöhte Expression von *P21CIP1* (s. Abb. 1.19 und Abb. 1.20).

Dass KL1 in Säugerzellen die Promotoraktivität reprimieren kann, wurde in einem Gal4-Reporter-Assay nachgewiesen (s. Abb. 1.10). Ebenso reprimiert KL1 die Promotoraktivität eines *P21CIP1*-Promotorfragmentes, das die Positionen -94 bis +16 relativ zur Transkriptionsstartstelle umfasst, hierbei insbesondere die Miz1 vermittelte Transaktivierung (s. Abb. 1.30). Dieses Ergebnis lässt eine Interaktion beider Proteine am *P21CIP1*-Promotor vermuten, zumal das verwendete Fragment keine potenzielle KL1-Bindungsstelle enthält. Für den Transkriptionsfaktor Kaiso wurde eine DNA-Konsensussequenz (TCCTGCNA) identifiziert (Daniel JM et al., 2002), die auch von KL1 erkannt wird (Filion GJP et al., 2006). Am *P21CIP1*-Kernpromotor befinden sich Sequenzen an den Positionen -195 (TCCTGC) und -165 (CCTGC) relativ zur Transkriptionsstartstelle, die eine partielle Homologie zur o.g. Konsensussequenz aufweisen. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass KL1 an diese Sequenzen des *P21CIP1*-Promotors *in vitro* binden kann. In Oligonukleotid-Pulldown-Experimenten mit exogenem KL1 und Miz1 sowie der Miz1-Bindungsstelle (-32 bis +47) und der potenziellen KL1-Bindungsstellen am *P21CIP1*-Promotor als Oligonukleotide wurde für KL1 und Miz1 eine Bindung an beide Oligonukleotide nachgewiesen (s. Abb. 1.31). Die Bindung von KL1 an die Miz1-Bindungsstelle wurde unter Co-Expression von Miz1 verstärkt. Die Bindung von Miz1 an beide Oligonukleotide wurde unter Co-Expression von KL1 verstärkt. Neben dem Ergebnis, dass KL1 direkt an DNA-Sequenzen des *P21CIP1*-Promotors bindet, ist dieses Experiment ein weiteres Indiz für die bereits diskutierte Interaktion beider Proteine am *P21CIP1*-Promotor.

Die Bindung von KL1 an den *P21CIP1*-Kernpromotor *in vivo* konnte anhand einer Chromatin-Immunopräzipitations-Analyse gezeigt werden (s. Abb. 1.32). Die nach Immunopräzipitation mit dem KL1-Antikörper amplifizierte DNA-Menge aus Berei-

chen des Kernpromotors war zwar im Vergleich zur amplifizierten Menge an Input-DNA sehr gering, jedoch wurde 4,5fach mehr DNA amplifiziert als bei den unterschiedlichen Kontrollen (Kontrollantikörper, Kontrollsequenz). Eine mögliche Ursache für die geringe Menge an amplifizierter DNA nach der Immunopräzipitation könnte neben einer schwachen Bindung von KL1 oder einer geringen Menge an KL1-Protein an dem *P21CIP1*-Promotor auch eine geringe ChIP-Eigenschaft des KL1-Antikörpers sein. Die Spezifität der Immunopräzipitation von KL1 mit dem KL1-Antikörper während der ChIP-Analyse am *P21CIP1*-Kernpromotor wurde in einer weiteren Promotoranalyse bestätigt (Weber A et al., 2008). In *KL1*-depletierten Zellen konnte im Vergleich zu Kontrollzellen nach Immunopräzipitation mit dem KL1-Antikörper keine DNA mit Primern des Kernpromotorbereichs amplifiziert werden.

Anhand dieser Experimente wurde gezeigt, dass KL1 die Transaktivierung des *P21CIP1*-Promotors reprimiert und die Repression durch direkte Bindung an den Promotor erfolgen kann – und möglicherweise auch über die Interaktion mit Miz1. Denn die in dieser Arbeit verwendeten Primer für die ChIP-Analyse amplifizieren Sequenzen des Kernpromotors (Positionen -102 bis -22 relativ zur Transkriptionsstartstelle), die zwar in der Nähe der potenziellen KL1-Bindungsstelle liegen, aber auch Teile der Miz1-Bindungssequenz enthalten. Wie essentiell Miz1 für die KL1 vermittelte Repression ist oder ob KL1 auch ohne Miz1 den *P21CIP1*-Promotor reprimieren kann, bleibt abzuklären. Hierzu müssten beispielsweise das Chromatin-Immunopräzipitations-Experiment und die *P21CIP1*-Expressionsanalysen in KL1 überexprimierenden Zellen unter gleichzeitiger Depletion von *MIZ1* wiederholt werden. Zumindest für die KL1-Bindung am *P21CIP1*-Kernpromotor, der die Miz1-Bindungsstelle einschließt, ist Miz1 notwendig. Weitere Promotoranalysen haben ergeben, dass deutlich weniger KL1 am Kernpromotor in *MIZ1*-depletierten Zellen bindet als in Kontrollzellen (Weber A et al., 2008). Ebenfalls scheint Miz1 die Bindung von KL1 an die KL1-Bindungsstelle des *P21CIP1*-Promotors positiv zu beeinflussen, denn auch hier nimmt die KL1-Bindung in *MIZ1*-depletierten Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen ab, jedoch nicht so stark wie am Kernpromotor. Dieses Ergebnis korreliert mit dem des Oligonukleotid-Pulldown-Experimentes dieser Arbeit. In diesem wurde gezeigt, dass exogenes KL1 auch ohne exogenes Miz1 an die KL1-Bindungssequenz des *P21CIP1*-Promotors und unter Co-Expression von Miz1 verstärkt an die Miz1-Bindungsstelle bindet (s. Abb. 1.31).

Physiologisch relevant könnte eine gemeinsame Regulation der *P21CIP1*-Transaktivierung durch KL1 und Miz1 in neuronalem Gewebe beispielsweise bei der Entwicklung des Rückenmarks sein. So reguliert p21Cip1 hier im Mausmodell neben p27Kip1 und p57Kip2 den zeitlichen Ablauf des Zellzyklusaustrittes (Gui H et al., 2007). Ebenso kontrolliert p21Cip1 die Teilung der adulten neuronalen Stammzellen des Vorderhirns (Kippin TE et al., 2005). Folglich muss auch die *P21CIP1*-Expression selbst reguliert sein, so dass Miz1 und KL1 möglicherweise auch eine Rolle bei der Regulation von neuronalen Stammzellen spielen. Dass Miz1 und KL1 in neuronalem Gewebe stark exprimiert werden, wurde bereits gezeigt (Peukert K et al., 1997 sowie eigene Daten). Expressionsanalysen von acht Wochen alten Mäusen ergaben, dass Miz1 und KL1 in verschiedenen Gehirnregionen wie beispielsweise im Cerebellum oder dem Hypothalamus und Thalamus des Zwischenhirns exprimiert werden (*allen brain atlas*). Um zu untersuchen, ob beide Proteine bei der Entstehung und Entwicklung der neuronalen Progenitorzellen eine Rolle spielen, müsste ihre Expression zu verschiedenen frühen (embryonalen) Entwicklungsstadien im Mausmodell (z.B. induzierbarer Knock-out) untersucht werden.

4.3 KL1 inhibiert die *P21CIP1*-Expression durch Interaktion mit HDACs

In dieser Arbeit wurden Histondeacetylasen als weitere Interaktionspartner von KL1 identifiziert. Zudem wurde nachgewiesen, dass die Histondeacetylase-Aktivität zur KL1 vermittelten Repression des *P21CIP1*-Promotors beiträgt.

KL1 interagiert mit der Histondeacetylase HDAC2, einem Co-Repressor, und mit HDAC6, einem Protein, das beispielsweise an der Aggresomenbildung beteiligt ist (Seigneurin-Berny D et al., 2001; Kawaguchi Y et al., 2003). Mit diesen Proteinen kann KL1 allein, aber auch im Komplex mit Miz1 interagieren (**s. Abb. 1.11 und Abb. 1.39**). Die Interaktion zwischen KL1 und HDAC2 sowie HDAC6 ist spezifisch, da zwischen KL1 und HDAC4 in Co-Immunopräzipitations-Analysen keine Interaktion nachgewiesen werden konnte. Um zu klären, ob die Bindung zwischen KL1 und den Histondeacetylasen, aber auch zwischen Miz1 und den Histondeacetylasen direkt ist oder über einen Mediator erfolgt, könnten auch hier In-vitro-Interaktionsstudien durchgeführt werden. In einem weiteren Schritt könnte analysiert werden, ob KL1 für die Interaktion zwischen Miz1 und den Histondeacetylasen notwendig ist. Zudem könnte geklärt werden, ob KL1 auch mit der Histondeacetylase HDAC1 interagieren

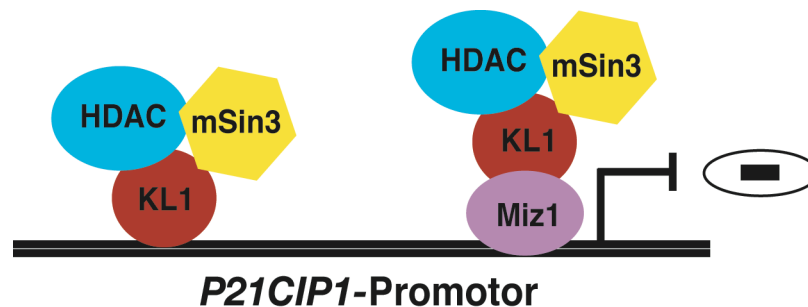
kann, da HDAC2 und HDAC1 oftmals gemeinsamer Bestandteil von Repressorkomplexen sind (**s. Einleitung 2.5**).

Mit HDAC2 kann KL1 vermutlich sowohl direkt als auch indirekt interagieren. In einer Zusammenarbeit mit dem Labor von Robert Eisenman, Seattle, konnte Dave Elzi in einer Co-Immunopräzipitations-Analyse zeigen, dass KL1 *in vivo* mit endogenem mSin3a und mSin3b interagieren kann (Weber A et al., 2008). Diese Repressorproteine bilden zusammen mit HDAC1 und HDAC2 die Plattform eines großen Repressorkomplexes. Die Integrität dieses Komplexes ist von einem weiteren Protein, Sds3, abhängig (Alland L et al., 2002). Dave Elzi konnte nachweisen, dass die Herunterregulation von Sds3 durch den Einsatz von shRNA zu einer verminderten Interaktion zwischen KL1 und HDACs führt. In einem Histondeacetylase-Aktivitätsassay nach Immunopräzipitation von exogenem KL1 in Zellen mit und ohne *SDS3*-Depletion nahm die Histondeacetylase-Aktivität unter *SDS3*-Depletion um ein Drittel ab (Weber A et al., 2008). Dies lässt gemeinsam mit den eigenen Daten vermuten, dass zum einen KL1 und HDAC2 zum Teil über Sds3 interagieren bzw. Sds3 für die Integrität des gesamten Komplexes verantwortlich ist, dass zum anderen KL1 und HDAC2 zum Teil unabhängig von Sds3 aneinander binden, da die Histondeacetylase-Aktivität nicht vollständig abnimmt, sondern nur um ein Drittel.

Neben den Ergebnissen zur Interaktion zwischen KL1 und den Histondeacetylase konnte in dieser Arbeit durch den Einsatz von Histondeacetylase-Inhibitoren gezeigt werden, dass die Histondeacetylase-Aktivität *in vivo* für die KL1 vermittelte Repression des *P21CIP1*-Promotors wichtig ist. Die Behandlung mit den HDAC-Inhibitoren TSA und Natriumbutyrat führte zu einer deutlichen Abnahme der KL1 vermittelten Repression der *P21CIP1*-Expression (**s. Abb. 1.33**). Unterstützt werden diese Daten durch die Ergebnisse einer von Dave Elzi durchgeführten Microarray-Analyse. In HCT116-Zellen, in denen die Expression von entweder KL1 oder mSin3a und mSin3b herunterreguliert wurde, gehört *P21CIP1* zu einer Gruppe von Genen, die unter beiden Bedingungen hochreguliert ist. In ChIP-Analysen konnte zudem gezeigt werden, dass KL1 mSin3a und mSin3b an den *P21CIP1*-Kernpromotor rekrutiert und dass die HistonH3-Acetylierung am *P21CIP1*-Kernpromotor in Zellen, die KL1 überexprimieren, im Vergleich zu Kontrollzellen abnimmt (Weber A et al., 2008).

Aufgrund dieser Daten wird davon ausgegangen, dass KL1 zur Repression des *P21CIP1*-Promotors neben einer möglichen Interaktion mit Miz1 mit dem mSin3-

HDAC-Repressorkomplex interagiert (**siehe Modell 1**). Da KL1 ebenfalls mit Miz1 interagiert und Miz1 im Komplex mit KL1 und HDAC2 (bzw. HDAC6) nachgewiesen wurde, wäre zudem interessant zu untersuchen, ob Miz1 ebenfalls mit mSin3a und mSin3b interagiert. Die Interaktion des Miz1/KL1-Komplexes mit den Histondeacetylasen am *P21CIP1*-Promotor bietet zudem ein weiteres Modell, wie Histondeacetylasen den *P21CIP1*-Promotor reprimieren. Bisher wurde vermutet, dass die Transkriptionsfaktoren Sp1 und Sp3 Histondeacetylasen binden und an den *P21CIP1*-Promotor rekrutieren (Lagger G et al., 2003).



Modell 1: KL1 hemmt die Transaktivierung des *P21CIP1*-Promotors durch Rekrutierung eines mSin3/HDAC-Repressorkomplexes. Dabei bindet KL1 direkt an den Promotor (links) bzw. bindet über Interaktion mit Miz1 an diesen (rechts).

Kaiso Like 1 reiht sich damit ein in eine Gruppe von POZ-ZF-Proteinen, die zur Ausübung ihrer transkriptionellen Repression mit HDACs interagieren. So interagiert beispielsweise PLZF über seine POZ-Domäne mit HDAC1, mSin3a, SMRT und NCoR (Melnick A et al., 2002; David G et al., 1998). Bcl-6 rekrutiert Histondeacetylasen über die Bindung mit mSin3a (Dhordain P et al., 1998). Das POZ-ZF-Protein Kaiso wurde als Teil des NCoR/HDAC-Repressorkomplexes (Yoon HG et al., 2003) sowie als Interaktionspartner von mSin3a (Dave Elzi, persönliche Kommunikation) nachgewiesen.

Neben der sequenzspezifischen DNA-Bindung wurde für KL1 eine Bindung an methylierte DNA beschrieben (Filion GJP et al., 2006). Folgearbeiten haben jedoch gezeigt, dass die DNA-Methylierung am *P21CIP1*-Promotor für die KL1 vermittelte Repression der *P21CIP1*-Expression keine Rolle spielt. Zellen, die KL1 überexprimieren, reprimieren die *P21CIP1*-Expression auch unter der Behandlung mit dem Methyltransferase-Inhibitor 5-Azacytidin. Dies korreliert mit dem vorgeschlagenen Modell, dass KL1 die *P21CIP1*-Repression über die sequenzspezifische Bindung an die KL1-Bindungsstelle und über die Interaktion mit Miz1 am *P21CIP1*-Promotor vermittelt.

4.4 KL1 – Modulator der p53-Antwort

4.4.1 Spezifische Resistenz *KL1*-depletierter Zellen gegenüber niedrig dosiertem Vincristin

Vorarbeiten mit Neuroblastomgewebeproben und Datenbank-Analysen haben ergeben, dass die mRNA-Expression von *KL1* in solidem Tumorgewebe im Vergleich zu Normalgewebe und in schlecht prognostischen Tumoren im Vergleich zu gut prognostischen soliden Tumoren herunterreguliert ist. Um mehr über die biologische Funktion von KL1 zu lernen – auch im Hinblick darauf, ob sich KL1 als „target“ in der Neuroblastomtherapie eignet, wurde getestet, wie die Neuroblastomzelllinie SH-EP auf eine *KL1*-Depletion unter Chemotherapie reagiert.

Als Chemotherapeutika wurden all-trans-Retinolsäure, Cisplatin, Etoposid und Vincristin verwendet, die auch in der klinischen Neuroblastomtherapie eingesetzt werden. Die Untersuchungen haben ergeben, dass die Herunterregulation der *KL1*-Expression zu keiner generellen Resistenz führt, sondern nur zu einer Resistenz gegenüber der Behandlung mit niedrig dosiertem Vincristin (**s. Abb. 1.14**), d.h. *KL1*-depletierte SH-EP-Zellen überleben im Gegensatz zu Kontrollzellen die Behandlung mit niedrig dosiertem Vincristin. Da in der Klinik meist eine Kombination aus unterschiedlichen Chemotherapeutika eingesetzt wird, eignet sich KL1 somit nicht als therapeutisches „target“ in der Neuroblastomtherapie. Dass die *KL1*-Depletion zu einer Resistenz gegenüber niedrig dosiertem Vincristin führt, konnte in einem weiteren Experiment bestätigt werden, in dem die Vincristinbehandlung zu einer Anreicherung von *KL1*-depletierten, mit GFP markierten Zellen führte (**s. Abb. 1.15**). Das Experiment wurde über eine Dauer von 13 Tagen mit drei verschiedenen gegen *KL1* gerichteten shRNA-Konstrukten in SH-EP-Zellpools durchgeführt, so dass „off target“-Effekte der shRNA und klonale Effekte der Zellen ausgeschlossen werden können. Interessanterweise reagieren *KL1*-depletierte Zellen nur resistent auf die Behandlung mit niedrig, nicht aber mit hoch dosiertem Vincristin. In einer FACS-Analyse zur Bestimmung des Zellzyklusprofils und des Anteils an apoptotischen Zellen nach der Behandlung mit niedrig und hoch dosiertem Vincristin für 48 Stunden zeigte sich, dass die Kontrollzellen apoptotisch auf die Behandlung mit niedrig dosiertem Vincristin reagierten, die *KL1*-depletierten Zellen jedoch mit einem G1-Arrest (**s. Abb. 1.16**). Folgeuntersuchungen haben dieses Ergebnis untermauert: Unter der Behandlung mit niedrig

dosiertem Vincristin war die Spaltung von Poly-ADP-Ribose-Polymerase (PARP), einem Marker für frühe apoptotische Ereignisse, in *KLI*-depletierten Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen um das ca. 10fache reduziert (Weber A et al., 2008). Die Behandlung mit hoch dosiertem Vincristin hingegen führte in Kontroll- und in *KLI*-depletierten Zellen zu Apoptose und zu einem G2/M-Arrest, wobei mehr *KLI*-depletierte Zellen in der G2/M-Phase arretierten und weniger in Apoptose gingen als Kontrollzellen (s. Abb. 1.16).

4.4.2 Niedrig dosiertes Vincristin aktiviert p53, induziert aber keine p53 DNA-Schadensantwort

Abgesehen von der all-trans-Retinolsäure, die über die Bindung an Retinolsäure-Rezeptoren Differenzierungsgene aktiviert, ist den Chemotherapeutika Cisplatin, Etoposid und Vincristin gemeinsam, dass sie p53 abhängige Signalwege aktivieren. Der Unterschied ist, dass die Behandlung mit Cisplatin und Etoposid einen DNA-Schaden verursacht. Über DNA-Checkpoint-Signalwege wird p53 aktiviert, das daraufhin einen Arrest in der G1- und der G2-Phase des Zellzyklus (oder Apoptose) initiieren kann. Vincristin hingegen schädigt nicht die DNA, sondern dereguliert die Mikrotubuli. Im Falle von niedrig dosiertem Vincristin kann dies zu einem p53 induzierten Arrest in der G1-Phase (oder zu Apoptose) führen.

Im Detail verursacht das Platinanalogon Cisplatin durch die kovalente Bindung seines Platinatoms an zwei Nukleinbasen eine Quervernetzung der RNA und der DNA und blockiert hierdurch Transkription und Replikation (Dronkert ML et al., 2001; McHugh PJ et al., 2001). Die Quervernetzung der DNA führt zu einem Anhalten der DNA-Replikationsmaschinerie, wodurch Checkpoint-Proteine der Zelle aktiviert werden. Diese können unter anderem zu einer Aktivierung von p53 führen, welches dann in Abhängigkeit von der Schwere des DNA-Schadens Zellzyklusarrest oder Apoptose initiiert (Schmitt E et al., 2007). Etoposid gehört zur Gruppe der Topoisomerase-II-Hemmer. Im Rahmen der Replikation stellen die Enzyme Topoisomerase I und II reversible Unterbrechungen im DNA-Strang her. Die Topoisomerase II spaltet beide Stränge der DNA, leitet einen intakten Doppelstrang durch die Lücke und versiegelt anschließend wieder die gespaltene DNA. Etoposid verhindert, dass diese Lücke

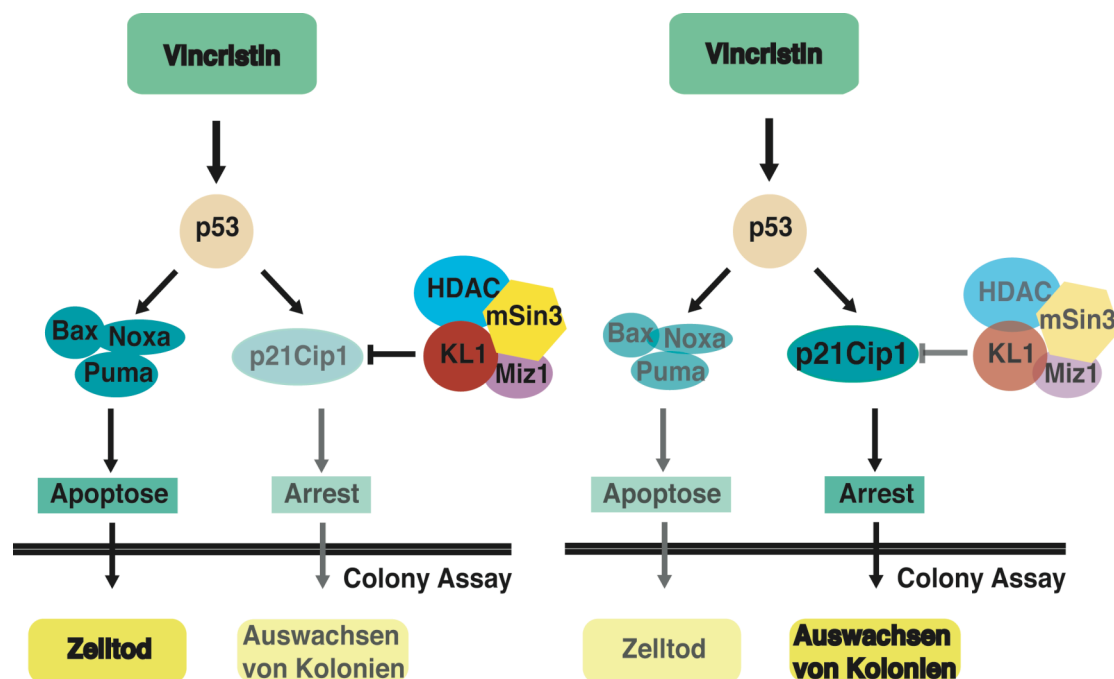
geschlossen wird, so dass ein Doppelstrangbruch entsteht. Hierdurch wird ein ATM-Chk2-p53-abhängiger Checkpoint-Signalweg induziert (Tanaka T et al., 2007), der ebenfalls je nach der Schwere des DNA-Schadens Zellzyklusarrest oder Apoptose induziert.

Vincristin gehört zur Gruppe der Vinca Alkaloide. Es übt seinen zytostatischen Effekt durch Interaktion mit α -Tubulin und β -Tubulin, den Bausteinen der Mikrotubuli aus, wodurch es deren Funktion stört (Jordan A et al., 1998). Niedrig dosiertes Vincristin (5nM) hemmt die Dynamik der Mikrotubuli, indem es die Rate des Anfügens und Abspaltens der einzelnen Tubuline an den Enden der Mikrotubuli herabsetzt. Hoch dosiertes Vincristin (50nM) zerstört das Netzwerk der Mikrotubuli, wodurch der Austritt aus der Mitose gestört wird. Unter niedrig, jedoch nicht unter hoch dosiertem Vincristin transloziert p53 in den Nukleus und aktiviert dort seine Zielgene (Giannakou P et al., 2002). Eigene Daten bestätigen, dass es unter der Behandlung mit niedrig dosiertem Vincristin zu einer Anreicherung von p53 und p21Cip1 sowie von Puma und Noxa in der Zelle kommt (**s. Abb. 1.17**). Zudem wurde in Folgeuntersuchungen für Kontrollzellen gezeigt, dass die Behandlung mit Etoposid, Adriamycin und Cisplatin zu einer Phosphorylierung von p53 an Serin 15 und die Behandlung mit Adriamycin und Cisplatin zusätzlich zu einer Phosphorylierung von Chk1 an Serin 345 führt, beides Hinweise auf eine ATM und/oder ATR vermittelte DNA-Schadensantwort. Im Gegensatz dazu konnte keine Phosphorylierung von p53 an Serin 15 und von Chk1 an Serin 345 nach der Behandlung mit Vincristin und Nutlin-3, einem Stabilisator der p53-Aktivität, der wie Vincristin keinen DNA-Schaden induziert, nachgewiesen werden (Weber A et al., 2008).

4.4.3 KL1 blockiert spezifisch den p53 induzierten G1-Arrest durch Repression der Transaktivierung von *P21CIP1*

Die zusätzliche Herunterregulation der *P21CIP1*-Expression in *KL1*-depletierten Zellen reduziert deutlich den Überlebensvorteil dieser Zellen gegenüber der Behandlung mit niedrig dosiertem Vincristin (**s. Abb. 1.23**). Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass KL1 unter Vincristinbehandlung über die Repression der *P21CIP1*-Expression die p53-Antwort – G1-Arrest oder Apoptose – moduliert. In *KL1*-depletierten Zellen entfällt die Hemmung der *P21CIP1*-Expression durch KL1. Nach der Aktivierung durch niedrig dosiertes Vincristin aktiviert p53 die *P21CIP1*-Expression und induziert

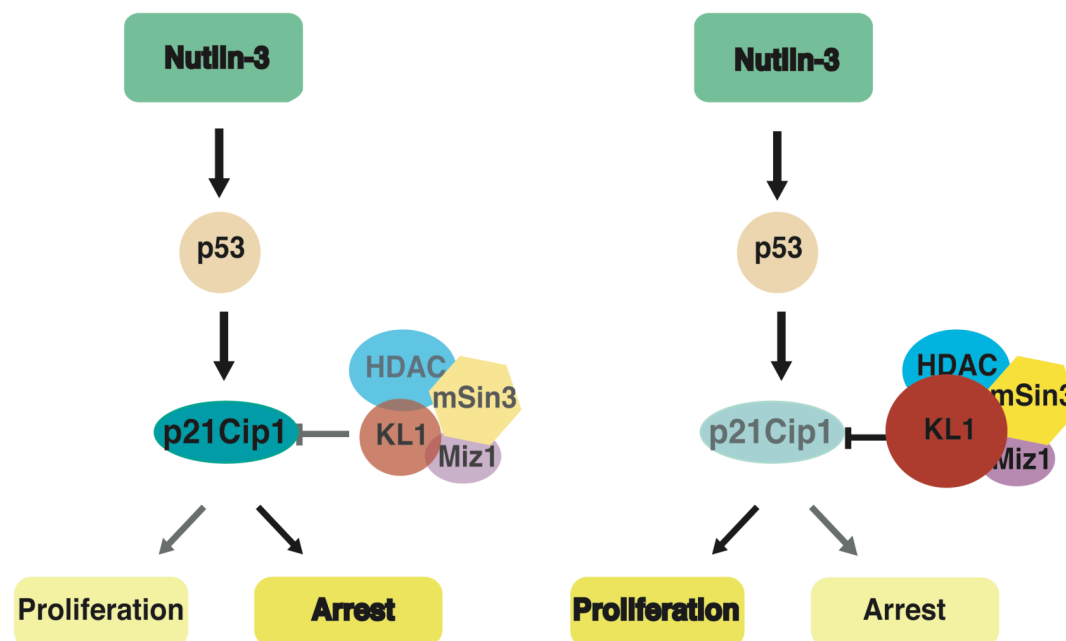
damit einen G1-Arrest. Unterstützt wird diese Aktivierung vermutlich dadurch, dass p53 eine höhere intrinsische Affinität zum *P21CIP1*-Promotor besitzt als zu den Promotoren seiner pro-apoptotischen Zielgene. Die p53-Antwort verschiebt sich somit in *KL1*-depletierten Zellen unter der Behandlung mit niedrig dosiertem Vincristin von Apoptose zu einem G1-Arrest. Der Arrest führt zu einer Proliferationsverzögerung mit anschließend niedriger Proliferationsrate (**siehe Modell 2**). Die Transkription der pro-apoptotischen p53-Zielgene *NOXA*, *PUMA* (**s. Abb. 1.20**) und *BAX* werden nicht von *KL1* reguliert (Weber A et al., 2008).



Modell 2: Depletion von *KL1* führt zur Resistenz der Zellen gegenüber Vincristin, indem es den p53 vermittelten G1-Arrest nicht mehr hemmen kann.

Niedrig dosiertes Vincristin führt zu einer Aktivierung von p53. Dieses bindet daraufhin an die Promotoren seiner pro-apoptotischen Zielgene *BAX*, *PUMA* und *NOXA* sowie am Promotor des Zellzyklusinhibitors *P21CIP1*. Die Transaktivierung der *P21CIP1*-Expression wird jedoch durch den *KL1*-Repressorkomplex gehemmt. Daher kann p53 nur die Expression seiner pro-apoptotischen Zielgene aktivieren, die daraufhin Apoptose induzieren (links). Die Depletion von *KL1* verschiebt die p53-Antwort in Richtung G1-Arrest, da die Hemmung der Transaktivierung von *P21CIP1* durch *KL1* entfällt. Zudem hat p53 eine höhere intrinsische Affinität zum *P21CIP1*-Promotor als zu den Promotoren seiner pro-apoptotischen Zielgene. Der Arrest führt zu einer Proliferationsverzögerung mit anschließend niedriger Proliferationsrate (rechts).

Umgekehrt führt die Behandlung mit Nutlin-3, das keinen Zellschaden verursacht, in den untersuchten SH-EP-Kontrollzellen zu einem G1-Arrest (nicht zu Apoptose). Dieser wird durch die p53 vermittelte Transaktivierung von *P21CIP1* erzielt. In Zellen, die KL1 überexprimieren, hemmt dieses die Transaktivierung von *P21CIP1*. Die Zellen arretieren daher nicht in der G1-Phase (s. **Abb. 1.25 bis Abb. 1.27**), sondern zeigen dasselbe Zellzyklusprofil wie die mit Lösungsmittel behandelten Zellen (**siehe Modell 3**).



Modell 3: Überexpression von KL1 führt zur Resistenz gegenüber Nutlin-3 durch Hemmung des p53 vermittelten G1-Arrests.

Die in dieser Arbeit gewählten Konzentrationen an Nutlin-3 führen in SH-EP-Zellen zu einem G1-Arrest des Zellzyklus, nicht zu Apoptose. Der Hdm2-Antagonist Nutlin-3 stabilisiert und aktiviert p53, welches daraufhin sein Zielgen *P21CIP1* aktiviert. p21Cip1 induziert den G1-Arrest (links). (Überexprimiertes) KL1 hemmt die Transaktivierung der *P21CIP1*-Expression und damit die Induktion des G1-Arrests. Die Zellen proliferieren weiter. KL1 bildet dabei einen Repressorkomplex mit HDACs, mSin3 und Miz1 (rechts).

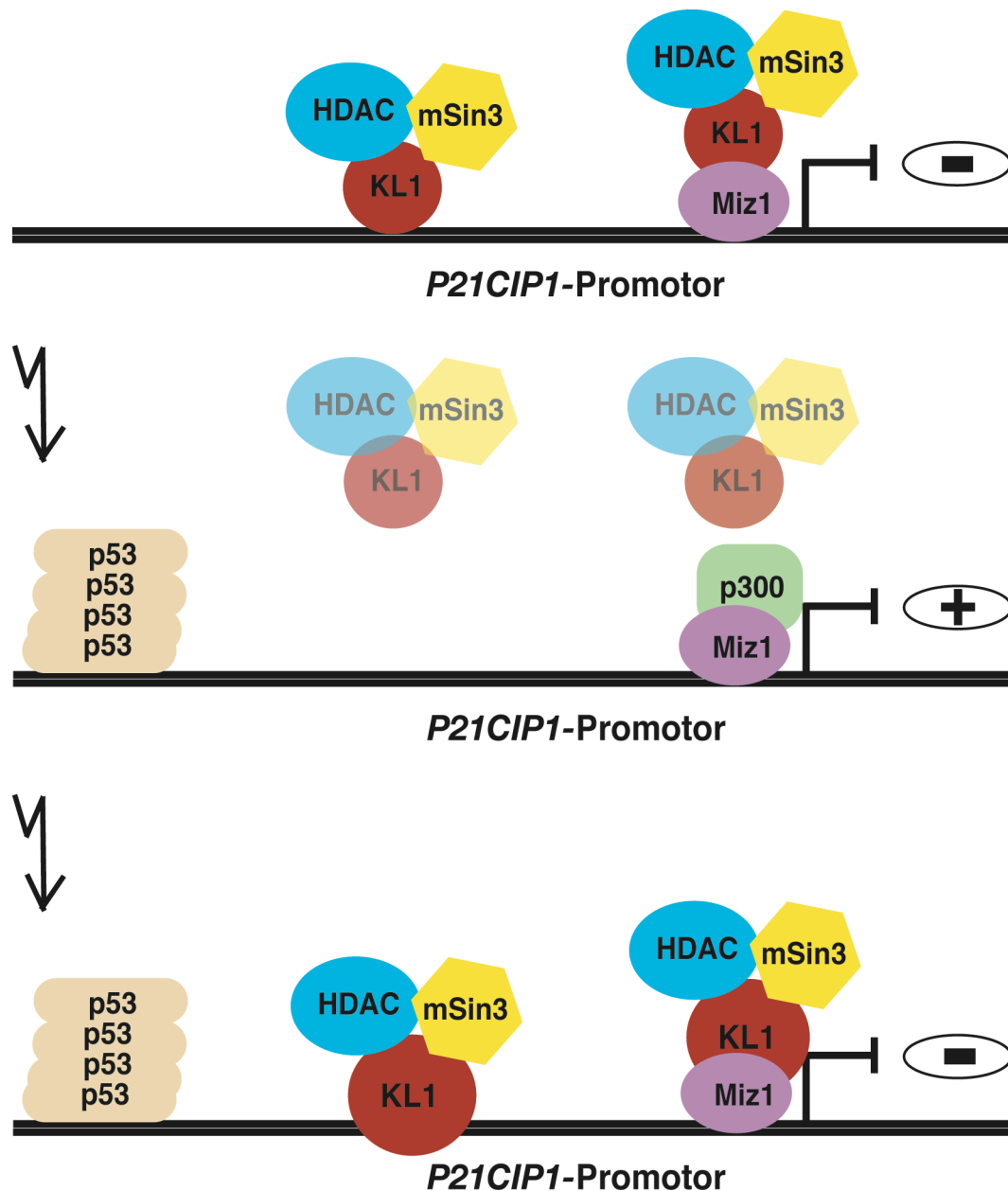
Unter der Behandlung mit Adriamycin arretieren mehr Zellen, die KL1 überexprimieren, in der S-Phase und weniger Zellen in der G1-Phase im Vergleich zu Kontrollzellen (s. **Abb. 1.27**). Weitere FACS-Analysen haben auch für die Behandlung mit Etoposid ergeben, dass Kontrollzellen einen G1- und G2-Arrest eingehen, Zellen, die KL1 überexprimieren, nur einen G2-Arrest (Weber A et al., 2008). Die Ursache hierfür ist vermutlich, dass der nach DNA-Schaden vermittelte G2-Arrest unabhängig von p21Cip1 ist (Hirao A et al., 2000). Daher arretieren KL1 überexprimierende Zellen nach Etoposidbehandlung in der G2-Phase.

Wie beschrieben blockiert KL1 den p53 vermittelten G1-Arrest durch Repression der Transaktivierung des gemeinsamen Zielgenes *P21CIP1*. Hierbei moduliert KL1 die p53-Antwort zwischen Zellzyklusarrest (und Möglichkeit zur späteren Proliferation) und Apoptose wie nach der Behandlung mit niedrig dosiertem Vincristin, das die Zelle durch Störung der Mikrotubuli-Dynamik schädigt, (**siehe Modell 2**) oder zwischen Zellzyklusarrest und Zellproliferation wie nach Behandlung mit Nutlin-3, das keinen Zellschaden verursacht (**siehe Modell 3**). Damit wurde KL1 in dieser Doktorarbeit in der Neuroblastomzelllinie SH-EP als ein weiterer Modulator der p53-Antwort identifiziert. Andere mögliche Modulatoren der p53-Antwort u.a. im Neuroblastom wurden bereits in der Einleitung besprochen (**s. Einleitung 2.2.1 und 2.2.5**).

4.4.4 KL1 hemmt die Transaktivierung der *P21CIP1*-Expression unabhängig von p53

Des Weiteren zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass KL1 die Transaktivierung der *P21CIP1*-Genexpression unabhängig von p53 hemmt. Zellen mit funktionell deletierten p53-Allelen (HCT116 p53^{-/-}), in denen die KL1-Expression durch Behandlung mit löslicher siRNA herunterreguliert wurde, weisen weiterhin eine im Vergleich zur Kontrollbehandlung erhöhte *P21CIP1*-Expression auf (**s. Abb. 1.29**). Weitere Promotoranalysen haben ergeben, dass KL1 auch unabhängig von p53 den *P21CIP1*-Promotor bindet (Weber A et al., 2008). Anhand einer ChIP-Analyse wurde die Bindung von KL1, Miz1 und p53 am *P21CIP1*-Promotor vor und nach der Behandlung mit Adriamycin getestet. Miz1 band gleich stark vor und nach der Behandlung an der Miz1-Bindungsstelle. Während p53 erst nach der Adriamycinbehandlung an die p53-Bindungsstelle des *P21CIP1*-Promotors rekrutiert wurde, befand sich KL1 bereits vor der Behandlung an der KL1- und Miz1-Bindungsstelle des *P21CIP1*-Promotors. Nach der Adriamycinbehandlung nahm seine Bindung sowohl an der KL1- als auch an der Miz1-Bindungsstelle ab. Dies führt zu einem weiteren Modell (**siehe Modell 4**): In ungestressten Zellen binden Miz1 und KL1 am *P21CIP1*-Promotor. Miz1 bindet vor allem an Bereichen des Kernpromotors, die seine Bindungsstelle enthalten. KL1 bindet ebenfalls an seine Bindungssequenz aber auch über die Interaktion mit Miz1 an der Miz1-Bindungsstelle. KL1 rekrutiert den mSin3-HDAC-Repressorkomplex zum *P21CIP1*-Promotor. Dieser trägt durch Deacetylierung von Histonen zu einer geschlossenen

Chromatinstruktur und damit zu einer Hemmung der Transaktivierung des *P21CIP1*-Promotors bei. Die Aktivierung von p53 wie nach Adriamycinbehandlung führt zu einer Bindung von p53 an seine Bindungsstellen am *P21CIP1*-Promotor, Miz1 bindet weiterhin am Kernpromotor. KL1 verlässt jedoch mitsamt des mSin3-HDAC-Repressorkomplexes den Promotor. Dies führt zu einer De-Repression des *P21CIP1*-Promotors. Proteine der Transkriptionsmaschinerie und Histonacetyltransferasen werden zum Promotor rekrutiert. Möglicherweise bindet die HAT p300 an Miz1. (In der Literatur wurde dies für den durch Miz1 aktivierten *P15INK4B*-Promotor gezeigt (Staller P et al., 2001).) *P21CIP1* wird exprimiert und kann einen G1-Arrest einleiten. Wird KL1 überexprimiert, dann bindet es auch nach Aktivierung von p53 durch beispielsweise Adriamycin weiterhin mit dem mSin3-HDAC-Repressorkomplex am *P21CIP1*-Promotor und verhindert auf diese Weise eine Transaktivierung der *P21CIP1*-Genexpression. In diesem Zusammenhang wäre es interessant zu untersuchen, welche Signale zu einem Ablösen von KL1 vom *P21CIP1*-Promotor führen (Proteininteraktion, Deacetylierung, Ubiquitinierung) und wo sich KL1 nach dem Ablösen vom Promotor befindet (mögliche Translokation ins Zytoplasma?) oder ob KL1 gegebenenfalls abgebaut wird.



Modell 4: Hemmung des *P21CIP1*-Promotors durch KL1.

In ungestressten Zellen hemmt KL1 die Transaktivierung der *P21CIP1*-Genexpression durch Interaktion mit dem HDAC/mSin3-Komplex und Miz1 am *P21CIP1*-Promotor (oben). Zellulärer Schaden führt zur Aktivierung von p53, welches daraufhin an den *P21CIP1*-Promotor bindet, während der Komplex aus KL1, HDAC und mSin3 den Promotor verlässt. Miz1 bindet weiterhin am Promotor und rekrutiert nun p300, eine Histonacetyltransferase. Die Expression von *P21CIP1* wird aktiviert (Mitte). Überexprimiertes KL1 bindet jedoch auch nach Aktivierung von p53 an den *P21CIP1*-Promotor und verhindert dessen Transaktivierung (unten).

4.5 KL1 – Tumorsuppressor oder Onkogen?

4.5.1 Tumorsuppressive Funktionen

4.5.1.1 Induktion der Apoptose

Dass Überexpression von KL1 zu einem Absterben der Zellen führt, wurde für verschiedene Zelllinien in dieser Arbeit gezeigt. Eine tumorsuppressive Funktion von KL1 könnte daher in der Induktion der Apoptose liegen. Für HeLa-Zellen wurde eine Anreicherung von Zellen, die KL1 überexprimieren, in der subG1-Region nachgewiesen (**s. Abb. 1.6**). Hier befinden sich Zellen mit geringem DNA-Gehalt ($< 2n$) wie apoptotische Zellen, da ihre DNA fragmentiert ist. Der genaue Mechanismus der KL1 vermittelten Apoptose wurde in dieser Arbeit nicht weiter untersucht. Möglicherweise hängt er mit der starken Repression der *P21CIP1*-Transaktivierung zusammen. Die KL1 vermittelte Apoptose ist jedoch vermutlich unabhängig von der p53 induzierten Apoptose, da auch HeLa-Zellen apoptotisch auf eine Überexpression von KL1 reagieren. In diesen Zellen ist der p53-Signalweg nicht funktional, da HeLa-Zellen neben Wildtyp p53 das humane Papillomavirus E6 exprimieren. E6 bindet p53 und veranlasst dessen beschleunigte Ubiquitin vermittelte Degradation (Huibregtse JM et al., 1993). Als ein weiteres Protein der BTB/POZ-Familie, das in einem p53-unabhängigen Apoptose-Signalweg involviert ist, wurde Zbtb38 beschrieben. Zbtb38 wurde hierbei als Substrat von Caspase-3 identifiziert (Oikawa Y et al., 2008). Im Gegensatz zur Überexpression von KL1 induziert die Herunterregulation der Zbtb38-Expression Apoptose.

4.5.1.2 Inhibition von onkogenem *P21CIP1*

Eine ambivalente Funktion könnte KL1 im Bezug auf seine Funktion als Repressor der *P21CIP1*-Expression ausüben. Denn für p21Cip1 wurde eine vom Kontext abhängige onkogene Funktion aufgrund seiner Fähigkeit beschrieben, die Induktion der Apoptose zu verhindern. Beispielsweise interagiert p21Cip1 in Abhängigkeit von seiner zytoplasmatischen Lokalisation mit pro-apoptotischen Proteinen und inhibiert dadurch apoptotische Signalwege, unter anderem Anoikis (**s. Einleitung 2.3.2**). Durch Anoikis werden diejenigen epithelialen Zellen eliminiert, die sich von der Basalmembran gelöst und den Zell-Zell- und Zell-Stratum-Kontakt verloren haben. Die Induktion der Anoikis ist daher vermutlich ein wichtiger Mechanismus, Metastasenbildung zu verhindern (Geiger TR und Peeper DS, 2005; Rennebeck G et al., 2005).

Interessanterweise gehört KL1 zu einer Pan-Tumor-Expressionssignatur, die im Rahmen einer mRNA-Expressionsstudie zur Vorhersage von Metastasenbildung gefunden wurde ($p=0.003$) (Ramaswamy S et al., 2003). KL1 könnte in diesem Zusammenhang eine weitere tumorsuppressive Funktion durch Repression der *P21CIP1*-Expression ausüben.

Seine tumorsuppressiven Fähigkeiten, Apoptose zu induzieren und die Transaktivierung von (onkogenem) *P21CIP1* zu hemmen, könnten Ursachen dafür sein, weshalb die mRNA-Expression von *KL1* im Tumorgewebe im Vergleich zu Normalgewebe sowie in schlecht prognostischen Tumoren (höheres Stadium, Metastasenbildung) im Vergleich zu gut prognostischen herunterreguliert ist. Allerdings muss an dieser Stelle betont werden, dass sich die Expressionsanalysen von KL1 zu den verschiedenen Tumorstadien auf seine mRNA und nicht auf das Protein beziehen. Ein Rückschluss von der Menge an mRNA auf die Menge an Protein ist nicht ohne weiteres möglich. Um zu überprüfen, ob in den Tumoren, die mit einer schlechten Prognose einhergehen weniger KL1-Protein vorhanden ist als in solchen mit einer guten Prognose, müssen Gewebeschnitte mit KL1-Antikörper gefärbt werden bzw. Western-Blot-Analysen erfolgen.

4.5.2 Onkogene Funktionen

4.5.2.1 Inhibition von tumorsuppressivem *P21CIP1*

Denkbar wäre auch eine regulatorische Funktion der *P21CIP1*-Expression durch KL1 während der Entwicklung und in adulten Zellen, denn in vielen terminal differenzierten Geweben wie der Skelettmuskulatur, dem Knorpel, der Haut und dem Nasenepithel wird die *P21CIP1*-Expression unabhängig von p53 reguliert (Parker SB et al., 1995). Dysreguliertes KL1 könnte in diesem Zusammenhang eine onkogene Funktion einnehmen. Beispielsweise ist p21Cip1 an der Erneuerung von Keratinozyten (Topley GI et al., 1999) und der Proliferation von Hepatozyten *in vivo* beteiligt (Albrecht JH et al., 1998; Wu H et al., 1996; Luedde T et al., 2003) sowie an der Aufrechterhaltung eines Stammzellpools des hematopoietischen Systems (Cheng T et al., 2000). KL1 könnte die Transaktivierung von *P21CIP1* hierbei reprimieren, um den Zellzyklus inhibitorischen Effekt von p21Cip1 aufzuheben und somit Zellproliferation zu ermöglichen. Entfällt die Regulation der KL1-Aktivität, zu der beispielsweise sein Abbau oder die Herunterregulation seiner Expression zählen könnten, würde dies durch

dauerhafte Repression der Transaktivierung von *P21CIP1* zu unkontrollierter Zellproliferation führen. In adulten Mäusen könnte über einen induzierbaren KL1-Knock-out untersucht werden, inwieweit KL1 für die Regulation der *P21CIP1*-Expression benötigt wird und über einen induzierbaren Knock-in, ob KL1 durch die permanente Repression der *P21CIP1*-Expression zur Tumorentstehung beiträgt. Des Weiteren könnten diese Tumoren mit HDAC-Inhibitoren behandelt werden, um zu untersuchen, ob hierdurch die KL1 vermittelte Repression der Transaktivierung von *P21CIP1* auch im Mausmodell aufgehoben wird und ob diese Behandlung das Tumorstwachstum hemmt. *KL1*-defiziente Mäuse könnten darüber hinaus Auskunft geben, inwieweit KL1 generell für die Entwicklung – auch von Neuroblasten – notwendig ist.

4.5.2.2 Kooperation mit Myc im Wnt-Signalweg

In dieser Doktorarbeit konnte ebenfalls gezeigt werden, dass KL1 über die Bindung an Miz1 auch mit Myc interagieren kann (**s. Abb. 1.40**). Co-Immunopräzipitations-Analysen haben ergeben, dass KL1 an MycWT, nicht jedoch an MycVD, einer Mutante, die nicht mit Miz1 interagieren kann, bindet. Der Beitrag von Myc zur KL1 vermittelten Repression der *P21CIP1*-Expression wurde in dieser Arbeit nicht weiter untersucht. Es wurde aber bereits gezeigt, dass Myc die p53 vermittelte Induktion der *P21CIP1*-Expression über die Bindung an Miz1 reprimieren kann und damit die p53 vermittelte Apoptose begünstigt (Seoane J et al., 2002). Falls Myc und KL1 gemeinsam die *P21CIP1*-Expression reprimieren, könnte dies *in vivo* in Darmkrebszellen mit dereguliertem kanonischem Wnt-Signalweg eine Rolle spielen. Dieser Signalweg ist u.a. wichtig für die epitheliale Homeostase (Korinek V et al., 1998; Kuhnert F et al., 2004; Pinto D et al., 2003) und bedingt die kolorektale Krebsentstehung, initiiert durch aktivierende Mutationen in der Wnt-Kaskade (Korinek V et al., 1997; Morin PJ et al., 1997; Polakis P, 1999). Nach Aktivierung binden Wnt-Proteine an Rezeptoren und aktivieren dabei eine Signalkaskade, in deren Zuge ein Komplex aus APC, Axin und GSK-3 β von β -Catenin dissoziiert und dieses daraufhin im Nukleus den T-Cell Faktor Tcf aktiviert, welcher seine Zielgene wie *MYC* und *MMP7* aktiviert (Kolligs FT, Bommer G, Göke B, 2002). In kolorektalen Krebszelllinien mit mutiertem APC reprimiert Myc die *P21CIP1*-Expression. In Darmkrypten von *APC*- und *MYC*-defizienten Mäusen hingegen ist die *P21CIP1*-Expression erhöht und trägt zu einem Verlust eines Phänotypes der Krypten bei, der Vorläuferzellen ähnelt (Sansom OJ et

al., 2007). Möglicherweise wird KL1 in diesem Zusammenhang über die Bindung an Miz1 für die Repression der *P21CIP1*-Expression durch Myc benötigt und übt dabei sogar eine onkogene Funktion aus. ChIP-Analysen zeigen, dass Myc und Miz1 in Kolonkarzinomzellen an den *P21CIP1*-Promotor binden (van de Wetering M et al., 2002). Zellkulturexperimente dieser Arbeit haben ergeben, dass KL1 die Transaktivierung von *P21CIP1* in der Kolonadenokarzinomzelllinie HCT116 hemmen kann. Und mRNA-Expressionsanalysen von KL1 in unterschiedlichen humanen Geweben zeigen, dass KL1 neben dem Gehirn auch im Dünndarm stark exprimiert wird (**s. Einleitung Abb. 6**). Zudem haben virtuelle Motiv-Analysen ergeben, dass KL1 ein potenzielles Bindungsmotiv für den EphrinB2-Rezeptor besitzt, ein aktiviertes Zielgen des kanonischen Wnt-Myc-Signalweges (Sansom OJ et al., 2007), so dass Myc möglicherweise über den EphrinB2-Rezeptor KL1 aktiviert. Allerdings haben eigene Experimente ergeben, dass co-exprimiertes Myc zu einer verminderten Überexpression von KL1 führt (Daten nicht gezeigt). Dass Myc die Expression von KL1 hemmt, kann jedoch auch Teil eines negativen Rückkopplungsmechanismus sein. Sollte KL1 tatsächlich für die Myc vermittelte Repression des *P21CIP1*-Promotors essentiell sein, dürften *KLI*-defiziente Mäuse bei gleichzeitiger Überexpression von Myc bzw. Mäuse, die defizient für *KLI* und *APC* sind, keine Tumoren bilden.

4.5.2.3 Aktivierung von *WNT5B*

Auch eine weitere Rolle von KL1 im Wnt-Signalweg ist denkbar. Wie die Microarray-Analyse mit SH-EP-Zellen, die KL1 überexprimieren, ergeben hat, wird in diesen Zellen nicht nur *P21CIP1* reprimiert, sondern werden andere Gene im Vergleich zu Kontrollzellen stärker exprimiert. Zwei besonders stark exprimierte Gene sind *WNT5B* und *TRIM58* – bestätigt durch quantitative Echtzeit-PCR-Analysen (**s. Abb. 1.41**). Die Funktion von Trim58 ist derzeit noch nicht charakterisiert. Wnt5b ist jedoch ein Protein, das im nicht-kanonischen Wnt-Signalweg eine aktivierende Rolle spielt. Dieser kontrolliert Gewebepolarität und Zellbewegung durch die Aktivierung von RHOA-, JNK- und NLK-Signalkaskaden. Während der Embryonalentwicklung von Säugern spielt der nicht-kanonische WNT-Signalweg u.a. eine Rolle bei der Orientierung der sensorischen Haare im Innenohr und der neuronalen Axon-Ausrichtung. Unkontrollierte Aktivierung des Signalweges führt zu abnormaler Gewebepolarität und Metastasierung. Über die vermutlich indirekte Aktivierung der *WNT5B*-Expression könnte KL1 möglicherweise eine weitere onkogene Funktion ausüben. *WNT5B*

wird beispielsweise in Krebszelllinien des Magens exprimiert (Saitoh T und Katoh M, 2001; Katoh M, 2005). Ob Wnt5b und KL1 möglicherweise auch im Stammzell-Kompartiment von Keratinozyten eine Rolle spielen, bleibt zu überprüfen. Miz1 scheint hier ein adulter Stammzellfaktor zu sein. Es verhindert die Mobilisierung der Stammzellen aus dem Kompartiment durch Inhibition der Expression eines weiteren Wnt-Proteins, Wnt3, und durch Aktivierung der Expression von DKK-1 und Dapper-1, Negativregulatoren des Wnt-Signalweges (Prof. Dr. Martin Eilers, persönliche Kommunikation). DKK-1 wird interessanterweise (neben SFRP1) durch c-Myc reprimiert, um epitheliale Brustzellen zu transformieren (Cowling VH et al., 2007).

4.6 Weitere mögliche Funktionen von KL1

Möglicherweise übt KL1 neben der Funktion als Transkriptionsfaktor weitere Funktionen aus. In dieser Arbeit konnte beispielsweise überexprimiertes KL1 und auch Miz1 mit HDAC6 co-immunopräzipitiert werden (**s. Abb. 1.11 und Abb. 1.39**). HDAC6 kann mit Mikrotubuli assoziieren und α -Tubulin, eine Untereinheit der Mikrotubuli, deacetylieren (Hubbert C et al., 2002). Hierdurch wird vermutlich Mikrotubuli-abhängige Zellmotilität vermittelt. HDAC6 kann zudem über die Deacetylierung von Cortactin die Aktin-abhängige Zellmotilität und damit Metastasenbildung beeinflussen (Zhang X et al., 2007). Möglicherweise reguliert KL1 diese Prozesse durch Interaktion mit HDAC6. HDAC6 zählt zur Klasse II der Histondeacetylase, die im Nukleus und Zytoplasma durch ihre reversible Interaktion mit dem 14-3-3-Protein lokalisiert sein können (Verdin E et al., 2003), so dass KL1 und möglicherweise auch Miz1 als nukleäre Proteine mit HDAC6 interagieren können.

Zudem wurde HDAC6 als multivalenter Adaptor identifiziert, welcher gleichzeitig Dynein/Dynaktin der Mikrotubuli und Multiubiquitinketten falsch gefalteter Proteine binden kann, und somit zur Aggresomen-Bildung beiträgt (Seigneurin-Berny, D et al., 2001; Kawaguchi Y et al., 2003). Möglicherweise übt auch hier KL1 eine regulatorische Funktion auf den Ubiquitinierungs-Signalweg durch Interaktion mit HDAC6 aus.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Kaiso Like 1 (Zbtb4) ist ein neu identifiziertes Protein, das zur Familie der BTB/POZ-Domänen-Zinkfinger-Proteine zählt. Aufgrund seiner Homologie zu dem Transkriptionsfaktor und POZ-Protein Kaiso wurde es Kaiso Like 1 benannt. Wegen seiner Gruppenzugehörigkeit zu den BTB-Proteinen wird es auch Zbtb4 genannt. Zu Beginn der vorliegenden Arbeit war über Kaiso Like 1 (KL1) einzig bekannt, dass die Expression seiner mRNA in Neuroblastomen, die mit einer schlechten Prognose einhergehen, gegenüber Neuroblastomen mit einer guten Prognose herunterreguliert ist. Eine Oncomine-Datenbankanalyse hat dieses Expressionsmuster für viele weitere solide Tumoren bestätigt. Ebenso hat sie ergeben, dass die mRNA-Expression von *KL1* in soliden Tumoren im Vergleich zu Normalgewebe herunterreguliert ist. Ziel dieser Arbeit war es daher, KL1 näher zu charakterisieren, hierbei Interaktionspartner und Zielgene sowie eine mögliche biologische Funktion zu identifizieren.

Zur Charakterisierung wurde KL1 im Zellkultursystem sowohl überexprimiert als auch depletiert. Eine starke Überexpression von KL1 induziert Apoptose in humanen Zelllinien, die durch eine FACS-Analyse nachgewiesen werden konnte. Zellen, die KL1 in geringen Mengen überexprimieren, sowie *KL1*-depletierte Zellen weisen jedoch unter normalen Zellkulturbedingungen keinen spezifischen Phänotyp im Vergleich zu Kontrollzellen auf. Um eine biologische Funktion von KL1 zu identifizieren, dessen mRNA-Expression in schlecht prognostischen Tumoren herunterreguliert ist, wurde *KL1* in der Neuroblastomzelllinie SH-EP depletiert und die Zellen mit verschiedenen in der Neuroblastomtherapie eingesetzten Chemotherapeutika behandelt. *KL1*-depletierte Zellen überleben die Behandlung mit niedrig dosiertem Vincristin, während die Kontrollzellen absterben. Vincristin induziert keinen DNA-Schaden, sondern hemmt, niedrig dosiert, die Dynamik der Mikrotubuli. Dies führt zu einer Aktivierung von p53, welches daraufhin seine pro-apoptotischen Zielgene sowie *P21CIP1* aktivieren kann, über das p53 den G1-Arrest im Zellzyklus vermittelt. In dieser Arbeit wurde die Ursache für die Resistenz *KL1*-depletierter Zellen herausgefunden: KL1 blockiert spezifisch den p53 induzierten G1-Arrest, indem es als Repressor die Transaktivierung seines neu identifizierten Zielgenes *P21CIP1* hemmt. In *KL1*-depletierten Zellen entfällt diese Repression, so dass sich die p53-Antwort nach Behandlung mit niedrig dosiertem Vincristin von Apoptose in Richtung G1-Arrest mit anschließend niedriger Proliferationsrate verschiebt. Eine gleichzeitige Depletion von *P21CIP1* hebt die Resistenz *KL1*-depletierter Zellen

gegenüber Vincristin größtenteils wieder auf. Um zu zeigen, dass KL1 die p53-Antwort generell und nicht nur nach Behandlung mit Vincristin moduliert, wurden SH-EP-Zellen, die KL1 überexprimieren, sowie Kontrollzellen mit Nutlin-3, einem Stabilisator der p53-Aktivität, behandelt. Während die Kontrollzellen unter den gewählten Bedingungen mit einem G1-Arrest (nicht mit Apoptose) auf die Behandlung reagieren, durchlaufen SH-EP-Zellen, die KL1 überexprimieren, einen normalen Zellzyklus.

Die KL1 vermittelte Repression der *P21CIP1*-Expression erfolgt dabei unabhängig von p53, wahrscheinlich durch Interaktion mit Miz1 und Histondeacetylase-Repressorkomplexen am *P21CIP1*-Promotor: In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Hemmung der Histondeacetylase-Aktivität zu einer Abnahme der KL1 vermittelten Repression der *P21CIP1*-Expression führt und KL1 die Miz1 vermittelte Transaktivierung des *P21CIP1*-Promotors in Reporter-Assays blockiert. Darüber hinaus wurde in Co-Immunoprecipitationsanalysen eine Interaktion zwischen den exogenen Proteinen KL1 und Miz1 unter anderem mit der Histondeacetylase 2 nachgewiesen. Ebenso gelang der Interaktionsnachweis von KL1 und endogenem Miz1. Eine In-vivo-Bindung von KL1 an den *P21CIP1*-Promotor und eine In-vitro-Bindung von KL1 an KL1-Bindungssequenzen des *P21CIP1*-Promotors sowie an Miz1-Bindungssequenzen, wenn Miz1 co-exprimiert wurde, konnte ebenso nachgewiesen werden.

In dieser Doktorarbeit wurde KL1 über die Hemmung von *P21CIP1* als ein weiterer Faktor in Neuroblastomzellen identifiziert, der die p53-Antwort kontrolliert. Andere Studien zeigen, dass p21Cip1 je nach zellulärem Kontext eine Funktion als Tumorsuppressor oder als Onkogen ausüben kann. KL1 als Repressor der *P21CIP1*-Expression könnte demnach die onkogene Funktion von p21Cip1 in soliden Tumoren hemmen. Darin könnte der Grund für die Herunterregulation der *KL1*-mRNA-Expression liegen. Als therapeutisches *target* eignet sich KL1 jedoch nicht generell. Die Herunterregulation seiner Expression führt nur spezifisch zu einer Resistenz gegenüber niedrig dosiertem Vincristin und nicht gegenüber anderen in der Neuroblastomtherapie eingesetzten Chemotherapeutika. Ursache hierfür ist, dass DNA schädigende Chemotherapeutika nicht nur einen p53 vermittelten G1-Arrest induzieren, der durch KL1 über Hemmung der *P21CIP1*-Expression blockiert werden kann, sondern auch einen G2-Arrest, der unabhängig von p21Cip1 ist.

Keywords: KL1 (Zbtb4), p53, p21Cip1, Miz1, Zellzyklusarrest, Apoptose

6. SUMMARY

The newly identified protein Kaiso Like 1 is a member of zinc finger proteins with a BTB/POZ domain and is therefore also named Zbtb4. Due to its homology to the transcription factor and POZ protein Kaiso it is named Kaiso Like 1 (KL1). Little was known about this protein before this thesis was initiated: A downregulation of *KL1* mRNA expression was observed in bad prognostic neuroblastoma tumours *versus* good prognostic neuroblastoma tumours. Data obtained from the oncomine-database confirmed this pattern of expression for many other solid tumour entities. In addition, data showed the downregulated expression of *KL1* mRNA in solid tumours compared to normal tissue. Therefore the characterisation of KL1, by e.g. identifying interaction partners, target genes and its potential biological function was the aim of this thesis.

In order to characterize KL1 overexpression and depletion assays were performed in human cell lines. Data showed that strong overexpression of KL1 leads to cellular death, identified as apoptosis by FACS-analysis. In contrast, cells overexpressing low amounts of the KL1 protein as well as cells depleted for *KL1* do not behave differently with respect to control cells under standard tissue culture conditions. To test the potential effect of *KL1* downregulation observed in bad prognostic tumours on the response of these tumours to chemotherapeutic agents, the neuroblastoma cell line SH-EP was depleted for *KL1*, then treated with vincristine or other chemotherapeutic agents commonly used in neuroblastoma therapy. Data showed that *KL1*-depleted SH-EP cells survive the treatment with low doses of vincristine while non-depleted cells die. Vincristine does not damage DNA but, at low doses, inhibits the dynamics of microtubules. This inhibition leads to an activation of p53 which can thereafter transactivate its pro-apoptotic genes as well as *P21CIP1*, through which p53 mediates a G1 arrest of the cell cycle. This resistance of *KL1*-depleted cells to vincristine-induced G1 arrest was found to be mediated by KL1. Therefore KL1 was identified as a repressor protein that induces a specific blockage of p53-mediated G1 arrest of the cell cycle mainly by inhibiting the transactivation of its newly identified target gene *P21CIP1*. When the expression of *KL1* is depleted, the repression of *P21CIP1* expression can no longer occur. As a consequence the p53 response shifts from apoptosis to a G1 arrest with a following low proliferation rate after treatment with low-dosed vincristine. This might explain why most cells, depleted simultaneously for

P21CIP1 and *KL1*, lose their resistance to low doses of vincristine. To demonstrate that KL1 does not only modify the p53 response due to vincristine treatment but acts in more general manner, cells overexpressing KL1 and control cells were treated with nutlin-3, a stabilisator of p53 activation. While control cells arrest in the G1 phase under the conditions used in the experiment (and do not become apoptotic), cells overexpressing KL1 cycle normally.

The KL1-mediated repression of the *P21CIP1* expression is independent of p53. Instead, KL1 probably interacts with Miz1 and histone deacetylase repressor complexes at the *P21CIP1* promoter: Experiments demonstrated that a histone deacetylase activity is needed for KL1-mediated repression of the *P21CIP1* expression. KL1 represses the Miz1-mediated transactivation of the *P21CIP1* promoter as shown by reporter assays. By performing co-immunoprecipitation analyses an interaction between the exogenous proteins KL1 and Miz1 and i.e. the histone deacetylase 2 was identified, as well as an interaction between KL1 and endogenous Miz1. Moreover the results showed that KL1 binds *in vivo* to the *P21CIP1* promoter, *in vitro* to KL1 binding sites and – when Miz1 is co-expressed – to Miz1 bindings sites of the *P21CIP1* promoter.

Through the inhibition of *P21CIP1* KL1 could be identified in neuroblastoma cells as a further factor controlling the activity of p53. Recent data showed that dependent on the cellular context, p21Cip1 acts either as a tumour suppressor or as an oncogene. KL1 as a repressor of *P21CIP1* gene expression might inhibit oncogenic function of p21Cip1 in solid tumours. This could therefore be the reason for the observed down-regulation of *KL1* mRNA expression in bad prognostic solid tumours. KL1 is not suitable as a general therapeutic target since its downregulation leads only to specific resistance against low doses of vincristine, not against other chemotherapeutic agents used in neuroblastoma therapy. This is due to the fact that the chemotherapeutic agents inducing DNA damage promote not only a p53-mediated G1 arrest, efficiently blocked by KL1 in a p21Cip1-dependent manner, but also a G2 arrest that is triggered independently from p21Cip1.

Keywords: KL1 (Zbtb4), p53, p21Cip1, Miz1, cell cycle arrest, apoptosis

7. MATERIAL

Chemikalien in Analysequalität sowie Feinchemikalien wurden von den Firmen Fermentas (St. Leon-Roth), Invitrogen (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) und Sigma-Aldrich (Taufkirchen) bezogen. Medium und Zusätze wurden von den Firmen Cambrex Bio Science (Verviers, Belgien) und Sigma-Aldrich geliefert. Teilweise werden diese sowie alle anderen Lieferanten in Klammern nach dem jeweiligen Material aufgeführt.

7.1 MATERIALIEN FÜR DIE ZELLKULTUR

Zellkulturschalen (Nunc Brand Produkte)

Zur Inaktivierung des Komplement-Systems wurden alle Seren, die den Medien zugefügt wurden, vor Gebrauch bei 56°C für 30Min inaktiviert.

DMEM-Vollmedium

DMEM, inkl. 1% L-Glutamin

10% FBS

1% Penicillin/Streptomycin (Stock: 10.000 u/ml Penicillin, 10mg/ml Streptomycin)

RPMI-Vollmedium

RPMI, inkl. 1% L-Glutamin

10% FBS

1% Penicillin/Streptomycin

DMEM/Ham's F12-Vollmedium

DMEM/Ham's F12 1:1 (PAA)

5% Horse Serum (PAA)

1% Penicillin/Streptomycin

1% L-Glutamin (Stock: 200mM in 0,85% NaCl-Lösung)

10µg/ml Insulin, 0,02%µg/ml EGF, 0,5µg/ml Hydrocortison

McCoy's-Vollmedium

McCoy's 5A Medium modifiziert

10% FBS

1% Penicillin/Streptomycin

1% L-Glutamin

Einfrierzusatz	DMSO (Dimethylsulfoxid, 100%)
Einfriermedium	65% Medium, 25% FCS, 10% DMSO
1xTrypsin/EDTA	89% kaltes 1xTBS, 10% 10xTrypsin, 1% 0,5M steriles EDTA
PBS pH 7,4	137mM NaCl 2,7mM KCl 10,1mM Na ₂ HPO ₄ 1,76mM KH ₂ PO ₄
UVB	Dosis 250J/m ²
AT-RA	Stock: 10mM in DMSO (Sigma); final: 10µM und 40µM
Vincristin	Stock: 10µM in DMSO; final: 3,5-5nM und 50nM
Etoposid	Stock: 1mM; final: 0,2µM
Nutlin-3	Stock: 10mM in DMSO (Sigma); final: 4µM und 8µM
Cisplatin	Stock: 10mM; final: 2µM
Trichostatin A	Stock: 1mg/ml in DMSO; final: 50ng/ml
Natriumbutyrat	Stock: 1M in dH ₂ O; final: 5mM
Doxycyclin	Stock: 1mg/ml in EtOH; final: 1µg/ml (Sigma)
Adriamycin (Doxorubicin)	Stock: 2mg/ml; final: 1µg/ml bzw. 0,5µg/ml

Selektionsantibiotika:

Puromycin (Cayla)	Stock: 10mg/ml; final: 2µg/ml
Zeocin (Cayla)	Stock: 100mg/ml; final: 100µg/ml
Neomycin (Calbiochem)	Stock: 200mg/ml; final: 400µg/ml
HygromycinB (Calbiochem)	Stock: 406mg/ml; final: 100µg/ml
Blasticidin (Cayla)	Stock: 10mg/ml; final: 5µg/ml

7.1.1 Zelllinien

HCT116 und HCT116 p53-/-

Kolonkarzinomzelllinie (kolorektal), freundlicherweise von Bert Vogelstein zur Verfügung gestellt.

HEK-293

Humane Nierenkarzinomzelllinie (ATCC).

HeLa

Humane Zervixkarzinomzelllinie (ATCC).

IMR-32

Humane Neuroblastomzelllinie (ATCC). IMR-32 weisen eine MYCN-Amplifikation sowie einen Verlust von Heterogenität (LOH) am Chromosom 1p auf. Sie tragen keine HDM2-Amplifikation und sind p53 Wildtyp (Carr J et al., 2006).

LS174T

Humane Kolonadenokarzinomzelllinie (ATCC).

MCF10a

Humane nicht tumorigene epitheliale Zelllinie (ATCC).

Phoenix^{eco}-Helferzellen

Humane Verpackungszelllinie für rekombinante, ekotrophe Retroviren (MoMuLV) (Grignani et al., 1998).

~~SH-EP und SH-SY5Y~~

Humane Neuroblastomzelllinie, Subklon von SK-N-SH (ATCC). p53 und HDM2 Wildtyp, p14ARF Deletion (Carr J et al., 2006).

SH-SY5Y

Humane Neuroblastomzelllinie, Subklon von SK-N-SH (ATCC). p53 und HDM2 Wildtyp (Carr J et al., 2006).

7.2 MATERIALIEN FÜR DIE ZELLBIOLOGIE

7.2.1 Transfektion

2,5M CaCl₂

2xHBS pH 7,04 (NaOH) 280mM NaCl, 1,5mM Na₂HPO₄, 50mM HEPES

Lipofectamin RNAimax (Invitrogen) zur Transfektion von löslichen siRNA Oligonukleotiden

OptiMEM (Invitrogen)

7.2.2 Infektion

Polybrene Stock: 4mg/ml; final: 2,67µg/ml

7.2.3 Kristallviolett-Färbung

70% Ethanol, 0,1% Kristallviolett in 20% Ethanol

7.2.4 FACS-Analyse

BrdU Stock: 50mM in dH₂O; final: 20µM

Propidiumiodid-Lösung Stock: 1mg/ml; final: 46µg/ml

RNase A Stock: 10mg/ml; final: 24µg/ml

38mM NaCitrat

BrdU-FITC-Antikörper (Becton Dickinson)

1% BSA / 0,5% Tween-20 / PBS

2M HCl / 0,5% TritonX-100

0,1 M Na₂B₄O₇ pH 8,5

7.2.5 Reagenzien für die Immunofluoreszenz

Paraformaldehyd Stock: 3% PFA in PBS; final: 1% PFA in PBS

2% PHEM 18,14g PIPES

6,5g HEPES

3,8g EGTA

0,99g MgSO₄

ad 500ml mit dH₂O, pH 7,0 (KOH)

MBS 10mM Mops, pH 7,2

150mM NaCl

MBST	MBS mit 0,05% Tween-20
CHAPS	1%ig in PHEM gelöst
NGS	normal goat serum (Rockland)
Hoechst 33258	Stock: 10mg/ml, 1:8000 verdünnt (Sigma)

7.3 MATERIALIEN FÜR DIE MOLEKULARBIOLOGIE

7.3.1 Bakterienstämme

XL1-Blue	E.coli recAI end AI gyrA96 thi-I hsdR17 supE44 relAI lac [F'proAB lacI ^q ZM15 Tn10 (Tet ^r)] ^c
DH5a	E.coli F'/end A1 hsd R17 (r _k -m _k ⁺) g In V44 thi-1 recA1 gyrA(Nal ^r) relA1Δ (lacIZYAargF) U169 deoR (f80dlacΔ (lacZ)M15)

7.3.2 DNA-Vektoren

pBabe	Vektor für die Herstellung rekombinanter Retroviren im BOSC/Phoenix-System mit zusätzlichen Resistenzgenen gegen Puromycin, Hygromycin, Neomycin oder Zeocin (Morgenstern JP und Land H, 1990)
pcDNA3	eukaryotischer Expressionsvektor (Invitrogen)
pcDNA3.1/Myc-His	eukaryotischer Expressionsvektor (Invitrogen)
pcDNA4/TO	T-REx induzierbarer Expressionsvektor (Invitrogen)
pcDNA6/TR	Expressionsvektor für Tetrazyklin Repressor (Invitrogen)
pCR-XL-Topo	Klonierungsvektor (Invitrogen)
pCMV5'3HA	eukaryotischer Expressionsvektor (Tony Kouzarides, Cam- bridge)
pCMV5'Gal4HA	eukaryotischer Expressionsvektor (Tony Kouzarides, Cam- bridge)
TK-Luc Gal	eukaryotischer Luziferase-Reportervektor (Tony Kouzarides, Cambridge)
pUHD 10-3	eukaryotischer Expressionsvektor (ZMBH, Heidelberg)
p21Promotor Luc	eukaryotischer Luziferasereportervektor (Wafik El-Deiry, Philadelphia)
LacZ	CMV-β-Gal Expressionsplasmid (Invitrogen)

pRetrosuper	retroviraler eukaryotischer shRNA Expressionsvektor (Thijn Brummelkamp, Amsterdam)
pSuperNeoGFP	eukaryotischer shRNA Expressionsvektor (Thijn Brummelkamp, Amsterdam)

7.3.3 DNA modifizierende Enzyme

Restriktionsendonukleasen	Stock: 10U/μl; eine Einheit schneidet 1μg DNA. (Fermentas; Invitrogen; New England Biolabs)
T4 DNA Ligase	Stock: 10U/μl; Reaktionsvolumen: 1U/1μl (usb)
RapidLigationKit	(Roche)
Klenow	Stock: 5U/μl; 1U/1μg DNA (usb)

7.3.4 Medium für die Bakterienkultur

LB- Medium (Luria-Bertani)	50g Trypto-Peptide (Becton Dickinson) 25g Hefe-Extrakt (Becton Dickinson) 50g NaCl ad 5Liter mit dH ₂ O
LB-Agar	400ml LB-Medium 6g bakteriologischer Agar (Becton Dickinson)
LB-Agar-Platten: Antibiotika	LB-Agar und Antibiotika 100μg/ml Ampicillin (Stock: 100mg/ml, -20°C), 100μg/ml Kanamycin (Stock: 10mg/ml, 4°C)

7.3.5 Minipräparation von Plasmid-DNA aus Bakterien

STET-Puffer	8% Saccharose 50mM EDTA 50mM Tris, pH 8,0 mit dH ₂ O auffüllen, autoklavieren 0,5% TritonX-100 hinzugeben
Lysozym	Stock: 50mg/ml; final: 0,5mg/ml
TE-Puffer	100mM NaCl, 1mM EDTA, 10mM Tris/HCl pH 8,0
RNase A	Stock: 10mg/ml; final: 10μg/μl (Roche)
Isopropanol, Ethanol	70% (v/v)

7.3.6 Maxipräparation von Plasmid-DNA aus Bakterien

Plasmid-Maxi-Kit Jetstar (Genomed)

7.3.7 Gelextraktion bzw. Aufreinigung eines PCR-Produktes

QIAquick Gelextraktionskit/QIAquick PCR Aufreinigungskit (Qiagen)

7.3.8 Agarosegel

Agarose	für analytisches Gel (Invitrogen)
	für präparatives Gel (Seakem LE Agarose, Bio Whittaker)
50xTAE-Puffer	2M Tris-Base, 250mM NaAcetat, 50mM EDTA, pH 8,0
1xTAE-Puffer	1VT 50xTAE-Puffer und 49VT dH ₂ O
Ethidiumbromid	Stock: 10mg/ml; final: 0,3µg/ml
1kb DNA Marker	50% 1kb DNA Marker (Stock: 1µg/µl)
	33,3% TE
	16,7% Orange juice (6xDNA-Auftragspuffer)
Orange Juice	40% Sucrose
(6xDNA-Auftragspuffer)	Spatelspitze Orange G
	10mM EDTA pH 8,0

7.3.9 RNA-Isolierung (Zelllinien)

peqGOLD TriFast	(Peqlab)
DEPC-H ₂ O	1ml DEPC in 1l dH ₂ O, ü.N. bei 37°C inkubieren
Glycogen	(RNase frei, Fermentas)
Chloroform, Isopropanol, 70%EtOH in DEPC-H ₂ O	

7.3.10 RNA-Isolierung (Primärtumorgewebe)

RNeasyRNAextractionKit (Qiagen)

7.3.11 c-DNA Synthese mit Random Primern

DEPC-H₂O

Superscriptpuffer (5x first strand buffer)

dNTPs (Stock: 10mM)

RNasin (Promega)

Reverse Transkriptase (M-MLV RT) (Invitrogen)

Random Primer (Stock: 2mg/ml) (Roche)

7.3.12 PCR

Alle Primer sind gegen humane Gene gerichtet.

Primer für RT-PCR

5' <i>KL1</i> : GCGGCCTGCGAGCGTTCCTA	Ta = 60°C (DMSO)
3' <i>KL1</i> : GGGGGCTGGGTGGGCAAAAGTG	
5' <i>HDAC2</i> : ATAAAGCCACTGCCGAAGAA	Ta = 50°C (DMSO)
3' <i>HDAC2</i> : TCCTCCAGCCCAATTAACAG	
5' <i>HDAC4</i> : AGCGTGAGCAAGATCCTCAT	Ta = 50°C (DMSO)
3' <i>HDAC4</i> : GCCAAGTACTCAGCGTCTCC	
5' <i>HDAC6</i> : AAGTAGGCAGAACCCCCAGT	Ta = 55°C (DMSO)
3' <i>HDAC6</i> : GTGCTTCAGCCTCAAGGTTC	
5' <i>P27KIP1</i> : CCGGCTAACTCTGAGGACAC	Ta = 52°C
3' <i>P27KIP1</i> : TTCTGAGGCCAGGCTTCTT	
5' β 2-MIKROGLOBULIN: TCTCGCTCCGTGGCCT	Ta = 60°C (DMSO)
3' β 2-MIKROGLOBULIN: TCAGTAAGTCAACTTCAATGTCGGAT	
5' <i>P21CIP1</i> : CGGCCAGTGGACAGCGAGCAG	Ta = 58°C
3' <i>P21CIP1</i> : CAGCCGGCGTTTGGAGTGGTAGAA	

Primer für qRT-PCR

5' <i>KL1</i> : GCCGCTATTGTGAGAAAGTGTT	
3' <i>KL1</i> : CAGGCGGTAGAGCTTGAGTGTA	
5' β 2-MIKROGLOBULIN: TCTCGCTCCGTGGCCT	
3' β 2-MIKROGLOBULIN: TCAGTAAGTCAACTTCAATGTCGGAT	
5' <i>P21CIP1</i> : CACCTCACCTGCTCTGCT	
3' <i>P21CIP1</i> : GCGTTTGGAGTGGTAGAA	
5' <i>NOXA</i> : GAAGAAGGCGCGCAAGAAC	
3' <i>NOXA</i> : CCAAATCTCCTGAGTTGAGTAGC	
5' <i>PUMA</i> : GACGACCTCAACGCACAGTAC	
3' <i>PUMA</i> : CCCGAGTCCCTGACGTCCAC	
5' <i>TP53</i> : AGGCCTTGGAAGTCAAGGAT	
3' <i>TP53</i> : TTATGGCGGGAGGTAGACTG	

Primer für ChIP-qPCR:

5' *P21CIP1*-Kernpromotor (-102): GGGGCGGTTGTATATCAGG

3' *P21CIP1*-Kernpromotor (-22): CTCCACAAGGAACTGACTTCG

5' *P21CIP1*-Promotor-Kontrollregion (-2356): CTGTGGCTCTGATTGGCTTT

3' *P21CIP1*-Promotor-Kontrollregion (-2267): CCAGCCTCTTCTATGCCAGA

Red Taq-Polymerase

Stock: 1U/μl; final: 1,5U/30μl

Pfu Turbo-Polymerase (Stratagene)

Stock: 2,5U/μl; final: 1,25U/ 30μl

dNTPs

Stock: 10mM; final: 0,2mM);

Primer:

Stock: 10pmol/μl; final: 0,4pmol/μl

Immomix für qPCR (Bioline); DMSO

7.3.13 shRNA Oligonukleotide:

shRNA Oligonukleotide (sense und antisense) (Stock: 1μg/μl)

2x Annealing Puffer pH 7,4

200mM NaCl, 100mM HEPES

EB-Puffer (Qiagen)

10mMTris-HCl pH 8,5

KL1 und *P21CIP1* Sequenzen für shRNA-Design:

shRNA *KL1*-1: CTGCCGCTATTGTGAGAAA

shRNA *KL1*-2: ACATGGTCCTACCTGATGA

shRNA *KL1*-3: TCGCCAGCTCAATGAACA

shRNA *P21CIP1*-1: GAATGAGAGGTCCTAAG

shRNA *P21CIP1*-2: AACACCTCCTCATGTACAT

shRNA *P21CIP1*-3: GCGACTGTGATGCGCTAAT

shRNA SCR (scrambled): CATAAGCTGAGATACTTCA

5' Oligonukleotid:

5' GATCCCC XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX TTCAAGAGA
 YYYYYYYYYYYYYYYYYYYY TTTTGGAAA 3'

3' Oligonukleotid:

5' AGCTTTTCCAAAAA XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX TCTCTTGAA
 YYYYYYYYYYYYYYYYYYYY GGG 3'

(mit X=19mer sense-Orientierung und Y=19mer antisense-Orientierung)

Lösliche siRNA Oligonukleotide (Dharmacon) gegen *KL1* (smart pool) bzw. SCR

7.4 MATERIALIEN FÜR DIE BIOCHEMIE

7.4.1 Lysepuffer für die Herstellung von Zelllysaten

Proteaseinhibitoren (PI-Cocktail) (Sigma)

Der PI-Cocktail wurde frisch 1:1000 verdünnt zu allen Proteinlysepuffern hinzugegeben, ebenso 0,5mM DTT (Stock: 1M DTT).

<u>Lysepuffer (NP40)</u>	150mM NaCl 1% (v/v) NP-40 50mM Tris-Puffer pH 8,0
<u>Nuklearextrakt</u>	
Puffer A:	10mM HEPES-KOH pH 7,9 10mM KCl 1,5mM MgCl ₂ 0,5% NP40
Buffer B:	20mM HEPES-KOH pH 7,9 400mM NaCl 1,5mM MgCl ₂ 0,2mM EDTA 15% Glycerol
<u>IPH-Puffer</u>	50mM Tris pH 8,0 150mM NaCl 5mM EDTA 0,5% NP40
<u>HKMG-Puffer</u>	10mM HEPES-KOH pH 7,9 100mM KCL 5mM MgCl ₂ 0,5% NP40

7.4.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Bradford-Reagenz	0,01% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G 4,75% (v/v) Ethanol Inkubation ü.N. lichtgeschützt 10% (v/v) Ortho-Phosphorsäure
BSA	Stock: 1mg/ml (Albumin Fraktion V pH 7,0; Appli-Chem)
NaCl	150mM

7.4.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

4x Sammelgelpuffer	0,5M Tris-HCl pH 6,8 0,4% (w/v) SDS
4x Trenngelpuffer	1,5M Tris-HCl pH 8,8 0,4% (w/v) SDS 8mM EDTA
Laufpuffer	25mM Tris-HCl pH 8,3 0,2M Glycin 0,1% (w/v) SDS
Acrylamidstammlösung	30% (w/v) Acrylamid 0,8% (w/v) N,N'-Methylenbisacrylamid in dH ₂ O
3x SDS Probenpuffer	1x Sammelgelpuffer 3% SDS 3% β-Mercaptoethanol 20% Glycerol 0,02% Bromphenolblau
APS	Ammoniumpersulfat 10% (w/v) in dH ₂ O (Sigma)
TEMED	Tetramethylethyldiamin (AppliChem)
Molekulargewichtsmarker	PageRuler Prestained Protein Ladder (Fermentas)

Lösung zum Dehybridisieren von Membranen nach Western-Blot-Analyse:

100mM β-Mercaptoethanol (Stock: 14M), 2% SDS, 62,5mM Tris pH 6,7

Coomassie-Färbelösung

2% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R, 45% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Eisessig

Coomassie-Entfärbungslösung

25% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Eisessig, 0,1% (w/v) Kristallviolett in 20% Ethanol

7.4.4 Reagenzien für nicht-denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese

5xTBE	450mM Tris-Base ($C_4H_{11}NO_3$)
	450mM Borsäure
	10mM EDTA pH 8,0
Ethidiumbromid	Stock: 10mg/ml; final: 0,3µg/ml
Acrylamid/Bisacrylamid; 10% APS, TEMED; 1kb DNA-Marker; 6x DNA-Ladepuffer, 0,5xTBE	

7.4.5 Reagenzien für Western-Blot-Analyse

1x Blotpuffer	10% (v/v) Methanol, 20mM Tris-Base, 150mM Glycin
20x TBS, pH 7,4 (HCl)	1M Tris-Base, 3M NaCl
Waschpuffer TBST	20% (v/v) 20x TBS pH 7,4 und 0,2% Tween-20
Blocklösung	5% (w/v) Magermilchpulver, 1x TBST
	3% (w/v) Ovalbumin (Albumin from chicken egg white, grade II), 1xTBST (in Ziegen generierter Antikörper)
	5% (w/v) BSA, 1x TBST (Phospho-Antikörper)
Methanol	100% (zur Behandlung der PVDF-Membran)
PVDF-Membran	Immobilon-P, Transfer-Membran (Millipore)
Entwicklerlösungen	ECLplusWestern-Blot-Detektionsreagenzien (Amersham)
	Western-Blot Detektionssystem (Millipore)
Filme	ECL Hyperfilm (Amersham)
	Fuji Medical X Ray Filme (Fuji)

7.4.6 Antikörper

1. α - β -Tubulin	MAB3408, Chemicon; WB 1:1500
2. α -CDK2	M2, Santa Cruz; WB 1:2500
3. α -HA	HA.11, Covance; WB 1:1000, IP 10ng/µl, IF 1:300
4. α -HDAC1	H-51, Santa Cruz; WB 1:1000
5. α -His	anti-Penta His, Qiagen; WB 1:2500

6. α -KL1	Pierre-Antoine Defossez, Paris; IP 1:20, WB 1:200
7. α -Miz1	10E2, Herold et al., 2002; WB 1:400
8. α -Miz1	H190, Santa Cruz; IP 5ng/ μ l
9. α -Myc	9E10, Evan et al., 1985; WB 1:1000
10. α -Myc	N262, Santa Cruz; IP 10ng/ μ l
11. α -p21	N20 Santa Cruz; WB 1:1000
12. α -p27	Kip1/p27 #K25020, Transduction Laboratories; WB 1:1000
13. α -p53	DO-1, Santa Cruz; WB 1:3000
14. α -Maus	"Horseradish peroxidase conjugated anti-mouse-antibody"; anti-Maus IgG-Antikörper #NA931, Amersham; WB 1:3000
15. α -Kaninchen	"Horseradish peroxidase conjugated anti-rabbit-antibody"; anti-Kaninchen IgG-Antikörper #NA934, Amersham; WB 1:3000
17. α -Maus Trueblot	Maus True Blot: HRP4-mouse IgG #18-8877, NatuTec; WB 1:1000
18. α -BrdU-FITC	#347583, Becton Dickinson
19. IgG Maus	IgG von Mausserum, Sigma; IP 5-10ng/ μ l
20. IgG Kaninchen	IgG von Kaninchenserum, Sigma; IP 5-10ng/ μ l
21. α -Rhodamin Maus	Rhodamin gekoppelter anti-Maus IgG-Antikörper, #111-025-003, Dianova; IF 1:60

7.4.7 Reagenzien für die Co-Immunopräzipitation

IPH-Puffer (s. 7.4.1)

Nuklear-Extrakt-Puffer (s. 7.4.1)

BSA (Stock: 5mg/ml; final: 200 μ g/ml)

Protein A Sepharose 4B (Zymed)

Protein G Sepharose fast flow (Sigma)

7.4.8 Reagenzien für Native Chromatinisolierung

<u>Puffer A</u>	10mM HEPES pH 7,9
	10mM KCl
	1,5mM MgCl ₂
	0,34M Sucrose
	10% Glycerol
NP-40	
<u>Puffer B</u>	3mM EDTA
	0,2mM EGTA
<u>Sonifizierungspuffer</u>	50mM Tris-HCl pH 8,1
	10mM EDTA
	1% SDS
Mikrokokkus Nuklease	1,5U/μl (Sigma)
1M CaCl ₂ ; 0,5M EGTA	

7.4.9 Reagenzien für die Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP)

Formaldehyd (Stock: 37%, final 1%), Glycin (Stock: 2,5M; final: 0,125M)

Lysepuffer I

5mM PIPES pH 8; 85mM KCl; 0,5% NP40

Lysepuffer II (RIPA-Puffer)

10mM Tris-HCl pH 7,5; 150mM NaCl; 1% NP40; 1% DOC; 0,1% SDS; 1mM EDTA

BSA (Stock: 20mg/ml in TE pH 8,0; final: 1mg/ml)

Sonifizierte Lachssperma-DNA (Stock: 10mg/ml; final: 400μg/ml) (Stratagene)

Proteinase K (Stock: 10mg/ml; final: 0,2μg/μl)

RNAse A (Stock: 10mg/ml; final: 0,1μg/μl)

Waschpuffer I

20mM Tris pH 8,1; 150mM NaCl; 2mM EDTA; 0,1% SDS; 1% TritonX-100

Waschpuffer II

20mM Tris pH 8,1; 500mM NaCl; 2mM EDTA; 0,1% SDS; 1% TritonX-100

Waschpuffer III

0,25M LiCl; 1% NP40; 1% Natriumdeoxycholat; 1mM EDTA; 10mM Tris pH 8,1

Elutionspuffer (inkl. Revertierung)

0,5% SDS, 0,05µg/µl Proteinase K, 0,05µg/µl RNase A in TE pH 8,0

7.4.10 Reagenzien für Oligonukleotid-Pulldown

Biotinylierte sense- und unmodifizierte antisense-Oligonukleotide (Stock: 1µg/µl; final: 0,01µg/µl)

10xAnnealing-Puffer: 0,5M NaCl; 0,2M Tris pH 7,4

Nicht-denaturierendes PAA-Gel (s. 7.4.4)

HKMG-Puffer (s.7.4.1)

Streptavidin-Agarose (Amersham)

Lachs-Sperma-DNA (Stock: 10mg/ml, final: 0,025µg/µl)

Zinkchlorid (final: 10µM)

7.4.11 Oligonukleotide für Oligonukleotid-Pulldown

P21CIP1-Promotor (Miz1-Bindungsstelle)

5'biotinyliertes Oligonukleotid

TTGTATATCAGGGCCGCGCTGAGCTGCGCCAGCTGAGGTGTGAGCAGCTG
CCGAAGTCAGTTCCTTGTG

3'unmodifiziertes Oligonukleotid

CACAAGGAACTGACTTCGGCAGCTGCTCACACCTCAGCTGGCGCAGCTCA
GCGCGGCCCTGATATACAA

P21CIP1-Promotor (KL1-Bindungsstelle)

5'biotinyliertes Oligonukleotid

GAGGGAAGTGCCCTCCTGCAGCACGCGAGGTTCCGGGACCGGCTGGCCTG
CTGGAACTCGGCC

3'unmodifiziertes Oligonukleotid

GGCCGAGTTCAGCAGGCCAGCCGGTCCCGGAACCTCGCGTGCTGCAGGA
GGGCACTTCCCTC

P21CIP1-Promotor (3'UTR)

5'biotinyliertes Oligonukleotid

GGTGACCCTGAAGTGAGCACAGCCTAGGGCTGAGCTGGGGACCTGGTACC
CTCCTGGCTCTTGA

3'unmodifiziertes Oligonukleotid

TCAAGAGCCAGGAGGGTACCAGGTCCCCAGCTCAGCCCTAGGCTGTGCTC
ACTTCAGGGTCACC

7.4.12 Reagenzien für Reporter-Assay

Kpi-Lyse-Puffer	1% TritonX-100 25mM Glycylglycin pH 7,8 15mM MgSO ₄ 4mM EGTA
Luciferin-Lösung	0,2mM D-Luciferin 20mM Glycylglycin pH 7,8
ATP-Lösung	2mM ATP pH 7,4 22,5mM Glycylglycin pH 7,8 10mM MgSO ₄
βGal-Puffer	60mM Na-Phosphat 1mM MgSO ₄ 10mM KCl frisch hinzufügen: 50mM β-Mercaptoethanol
ONPG:	6mg/ml in dH ₂ O

8. METHODEN

8.1 ZELLKULTUR

8.1.1 Allgemeine Zellkulturbedingungen

Alle verwendeten humanen Zelllinien SH-EP, SH-SY5Y, IMR-32, LS174T, HeLa, HEK-293, HCT116, MCF10a und Phoenix^{eco}-Helferzellen waren adhärent. Die Zelllinien SH-EP, SH-SY5Y, IMR-32 sowie LS174T wurden in RPMI-Vollmedium gehalten. Ecotrope Rezeptoren zwecks Infektion wurden von folgenden Zelllinien stabil exprimiert: SH-EP, SH-SY5Y, LS174T (Neomycinresistenz), IMR-32 (Hygromycinresistenz). Zur Infektion diente der Vektor pBabe-puro bzw. pBabe-bleo. SH-EP-Zellen mit T-REx-System (Invitrogen) wurden unter Blastizidin- (Tet-Repressor, TR, pcDNA6/TR) und Zeocin- (pcDNA4/TO) Selektion gehalten. Die Zelllinien HEK-293, HeLa und Phoenix wurden in DMEM-Vollmedium, MCF10a in DMEM/Ham's-Vollmedium und die Zelllinie HCT116 in McCoy's-Vollmedium gehalten. Die Zellen wurden in einem Heraeus-Brutschrank (B5060 EC-CO₂) bei 37°C, 5% CO₂ Atmosphäre inkubiert. Die Zellkulturarbeit wurde an einer sterilen Arbeitsbank (Heraeus Instruments Sterile Hood) durchgeführt.

8.1.2 Passagieren von Zellen

Zellen mussten abhängig von ihrer Wachstumsrate alle 3 bis 4 Tage 1:10 bis 1:20 verdünnt und neu ausplattiert werden (Passagieren), um einen Wachstumsstopp durch Kontaktinhibition zu vermeiden und um die Zellen mit neuen Nährstoffen zu versorgen.

Die Zellen wurden mit sterilem 1x PBS gewaschen und mit 200µl bis 500µl Trypsin-EDTA (Proteaseaktivität) im Brutschrank inkubiert, bis sie sich vollständig von der Zellkulturschale abgelöst hatten. Sie wurden anschließend in frischem Medium resuspendiert und auf neue mit Medium gefüllte Kulturschalen in der gewünschten Zelldichte ausplattiert. Vorhandenes Trypsin wurde durch den im Serum enthaltenen Trypsininhibitor inaktiviert.

8.1.3 Auftauen von Zellen

Die Zellen wurden im 37°C Wasserbad aufgetaut, abzentrifugiert – um das im Einfriermedium enthaltene DMSO von den Zellen zu trennen – und je nach Größe des Pellets in einer Ø 10cm oder 15cm Zellkulturschale ausplattiert.

8.1.4 Einfrieren von Zellen

Das Einfrieren von eukaryotischen Zellen diene der Aufbewahrung über einen längeren Zeitraum. Um die Bildung von schädlichen Eiskristallen beim Einfriervorgang zu vermeiden, wurden die trypsinisierten und gewaschenen Zellen in spezielles DMSO-haltiges Einfriermedium aufgenommen, in Zellkultureinfriereröhrchen überführt und langsam auf Lagertemperatur gebracht. Hierzu wurden sie in Papiertüchern in eine Box verpackt, auf -80°C heruntergekühlt und nach einigen Tagen für die langfristige Aufbewahrung in Lagertanks mit flüssigem Stickstoff überführt.

8.1.5 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl wurde mit einer modifizierten Neubauer-Zählkammer ermittelt.

Formel: $(\text{Zellzahl}/\text{Anzahl gezählter Quadrate}) \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10.000 = \text{Zellen/ml}$

8.1.6 Wachstumskurve

1×10^4 Zellen wurden in Triplikaten auf Ø 10cm Zellkulturschalen für jeden zu bestimmenden Zeitpunkt ausplattiert. Die Zellen wurden trypsinisiert und alle 24h ausgezählt.

8.1.7 Picken von Zellklonen

Um einzelne Zellklone voneinander zu separieren, wurden die Zellen in einer hohen Verdünnungsstufe (1:100 bis 1:500) ausplattiert. Die einzelnen Zellklone wurden mittels Klonierungsringen voneinander separiert und in 96er well-Kulturschalen überführt.

8.1.8 Behandlung von Zellen mit Zytostatika

Je nach Fragestellung wurden die Zellen (i.R. SH-EP-Zellen) mit unterschiedlichen Zytostatika für einen bestimmten Zeitraum behandelt. Wurde der Versuch über einen Zeitraum länger als drei Tage durchgeführt, wurde das Medium jeweils nach drei Tagen gewechselt und die Zytostatika frisch hinzugegeben. Mit folgenden Zytostatika wurde gearbeitet: AT-RA (10-40µM), Cisplatin (2µM), Adriamycin (0,5µg/ml und 1µg/ml), Doxycyclin (1µg/ml), Etoposid (0,2µM), Vincristin (3,5-5nM und 50nM), Nutlin-3 (4µM und 8µM).

8.1.9 Bestrahlung von Zellen mit UV

Je nach Fragestellungen wurden die Zellen (i.R. SH-EP-Zellen) mit UVB bestrahlt und anschließend für einen bestimmten Zeitraum weiter im Inkubator bis zur Ernte gehalten. Die Zellen wurden i.R. einen Tag vor der Bestrahlung in einer Zellzahl ausplattiert, so dass sie sich zum Zeitpunkt der Bestrahlung in einer exponentiellen Wachstumsphase befanden. Für die Bestrahlung wurde den Zellen das Kulturmedium entnommen und hinterher wieder hinzugegeben.

8.1.10 “colony formation”-Assay

1×10^4 Zellen wurden auf Ø 10cm Zellkulturschalen ausplattiert und je nach Fragestellung einer Behandlung ausgesetzt oder unbehandelt über einen längeren Zeitraum (7-14 Tage) im Zellkulturinkubator unter regelmäßigem Mediumwechsel inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und getrocknet. Sie wurden für 10Min mit 70%igem EtOH fixiert, mit Kristallviolett für 45Min gefärbt, mit Wasser gewaschen und getrocknet. Für einige Auswertungen wurde die Zelldichte durch Messung der Absorptionsrate von Kristallviolett quantifiziert. Der Farbstoff wurde extrahiert, indem die Schalen mit 2ml 10%iger Essigsäure für 5Min auf einem Schüttler bei 40rpm inkubiert wurden. 1ml hiervon wurde in ein Eppendorf-Gefäß transferiert. Die Absorption wurde bei 590nm gemessen. Hierzu wurden Verdünnungen zwischen 1:10 und 1:20 frisch angesetzt, so dass die Absorptionsrate unter 1,5 lag. Als Kontrollen dienten Schalen mit 0% und 100% Zelldichte, jeweils angefärbt mit Kristallviolett. Der Wert der Schale mit 0% Zelldichte diente als Hintergrundreferenz, der Wert der Schale mit 100% Zelldichte als Maß für die Absorptionsrate einer 100% konfluenten Zellkulturschale. Anhand dieses Verhältnisses wurde zur gemessenen Absorptionsrate die Zelldichte berechnet. Hierbei wurde angenommen, dass die Zelldichte der Absorptionsrate proportional ist.

8.1.11 Herstellung von KL1 induzierbaren SHEP-Zellklonen

SH-EP-Zellen wurden mit Tetrazyklin-Repressor-Protein (TR) transfiziert (pCDNA6/TR). Ohne Zugabe von Tetrazyklin bzw. des Tetrazyklin-Analogons Doxycyclin bindet dieser Repressor an zwei zwischen TATA-Box und CMV-Promoter vorgeschalteten Tetrazyklin-Operator-Sequenzen des Vektors pcDNA4/TO und inhibiert somit die Initiation der Transkription. Nach Zugabe von Tetrazyklin wird diese Repression aufgehoben, weil Tetrazyklin an den Repressor bindet und damit eine Konformationsveränderung verursacht, die zum Ablösen des

Repressors von der Operator-Sequenz und zur Initiation der Transkription führt. Somit konnte die kodierende Sequenz für KL1 in dem Konstrukt pcDNA4/TO-3HAKL1 zunächst stabil in die Zellen integriert werden, ohne dass das KL1-Protein überexprimiert wurde.

Mit einem Reporter-Assay wurde derjenige Zellklon gefunden, der den Tet-Repressor am stärksten reprimierte, da in diesem die Luziferaseaktivität nach Gabe von Doxycyclin am stärksten anstieg. Einzelne SH-EP-Zellklone, die den TR exprimieren, wurden mit einem pcDNA4/TO-Luziferasekonstrukt transfiziert, 1:2 gesplittet und jeweils die Hälfte der Zellen mit 1µg/ml des Tetrazyklin-Analogons Doxycyclin bzw. Ethanol für 65h inkubiert. (Ethanol diente als Kontrolle, um auszuschließen, dass die beobachteten Effekte nicht durch die Chemikalie *per se*, sondern durch das Lösungsmittel verursacht wurden.) Der Zellklon mit der stärksten TR-Expression, wurde mit dem induzierbaren Expressionsvektor pcDNA4/TO-3HAKL1 bzw. mit leerem Vektor transfiziert und mit Zeocin selektioniert. Zellklone wurden hergestellt und auf Expression von KL1 48h nach Zugabe von 1µg/ml Doxycyclin bzw. Ethanol im Western-Blot analysiert.

8.2 ZELLBIOLOGISCHE METHODEN

8.2.1 Transfektion und Virusernte von Verpackungszelllinien

Phoenix-Helferzellen wurden mit folgenden Konstrukten transfiziert und in Retroviren verpackt: pBabe-puro, pBabe-puro HA-markiertes *KL1*, pBabe-puro-*FYN*, pBabe-puro-*14-3-3ETA*, pBabe-bleo, pBabe-bleo HA-markiertes *KL1*, pBabe-H2BGFP, pRetrosuper-puro bzw. pRetrosuper-GFP-sh*KL1* -1, -2, -3.

24h vor Transfektion wurden 3×10^6 Phoenixzellen pro Ø 10cm Schale ausplattiert. Die Transfektion wurde nach der Kalzium-Phosphat-Methode durchgeführt; DNA-Kalzium-Phosphat-Präzipitate wurden von den Zellen endozytiert.

Reaktionsansatz für eine Ø 10cm Schale:

DNA	20µg
2,5M CaCl ₂	50µl
dH ₂ O	<u>430µl</u>
	0,5ml
2x HBS, pH 7,4	0,5ml

Der Reaktionsansatz bestehend aus DNA, Kalziumchlorid und Wasser wurde gevortext. Währenddessen wurde tropfenweise HBS zu dem Ansatz hinzugegeben. Das Gemisch wurde sofort auf die Zellen unter Schwenken der Zellkulturschale gegeben. 16h nach Transfektion wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und in 6ml Medium zur Ankonzentrierung des Virustiters inkubiert. 48h und 62h nach Transfektion wurde der virale Überstand von den Phoenixzellen geerntet: Der Überstand wurde in 15ml Falcon-Röhrchen überführt und bei 1200rpm für 10Min, 4°C in einer Heraeus-Minifuge abzentrifugiert. Zellreste konnten auf diese Weise von dem Überstand entfernt werden. Dieser wurde erneut in ein 15ml Falcon-Röhrchen überführt, ggf. aliquottiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Zur Überprüfung der Transfektionseffizienz wurden Zellen mit einem GFP-Konstrukt transfiziert (10µg GFP, 10µg leerer Vektor) und ca. 20h nach Transfektion die Anzahl an GFP-positiven Zellen mikroskopisch bestimmt.

8.2.2 Infektion von Zellen

Das Zellkulturmedium der Helferzellen, in dem die Retroviren freigesetzt waren, wurde zur Infektion der Zelllinien SH-EP, SH-SY5Y, IMR-32, LS174T verwendet.

Infektionsprotokoll: 12h-18h vor Infektion wurden 5×10^5 SH-EP-Zellen (1×10^6 IMR-32- und LS174T-Zellen) in einer Ø 10cm Schale ausplattiert. Die Zellen wurden mit einem Infektionscocktail – bestehend aus 2ml Medium, 8µl Polybrene und 3ml Virusüberstand (aufgetaut, 37°C Wasserbad) – infiziert und hierin für mindestens 16h (37°C, 5% CO₂) inkubiert. Anschließend wurden 5ml frisches Medium zu dem Infektionscocktail hinzugegeben und die Zellen hierin für weitere 24h inkubiert. 48h nach Infektion wurde mit der Antibiotika-Selektion begonnen. Nicht infizierte Zellen wurden ebenfalls mit Antibiotikum behandelt. Ihr Absterben gab den Abschluss der Selektion an.

8.2.3 Transfektion mit Lipofectamin RNAiMax

Ein Tag vor Transfektion wurden 1×10^5 Zellen in Antibiotika freiem Medium auf Ø 6cm Zellkulturschalen ausplattiert. Für die Transfektion wurden 10µl Lipofectamin RNAiMax mit 500µl OptiMEM und 60pmol lösliche siRNAs mit 500µl OptiMEM für 5Min inkubiert. Anschließend wurde die Lipofectamin-RNAiMax-Lösung zu der siRNA-Lösung gegeben und dieses Gemisch unter gelegentlichem Schwenken für 30Min bei RT inkubiert und danach auf die Zellen unter Schwenken der Zellkulturschale getropft. Die RNA-Analyse erfolgte 48h nach Transfektion, die Protein-Analyse 72h nach Transfektion.

8.2.4 PI-FACS-Analyse zur Bestimmung des DNA-Gehaltes von Zellen

Zur Analyse des Zellzyklusprofils wurde der DNA-Gehalt einer Zellpopulation in der Durchflusszytometrie bestimmt. Der Überstand sowie die trypsinisierten Zellen wurden in Polystyrol beschichtete Falkons überführt. Anschließend wurden sie für 5Min bei 1000rpm, 4°C in einer Heraeus-Minifuge abzentrifugiert und mit PBS gewaschen. Das Zellpellet wurde in 1ml PBS resuspendiert. 4ml eiskalter absoluter Ethanol wurden unter Vortexen der Zellsuspension hinzugeben und die Zellen bei -20°C über Nacht fixiert. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen, ihre Zellzahl bestimmt. Die Zellen wurden im Verhältnis 1×10^6 Zellen : 1µl RNase A (10mg/ml) : 15µl Propidiumiodid (1mg/ml) : 400µl PBS für 1h bei RT im Dunkeln inkubiert und anschließend für die Analyse in FACS-Röhrchen überführt. Der DNA-Gehalt wurde im Durchflusszytometer (Becton-Dickinson FACScalibur) im FL2-A (lin)-Kanal für Propidiumiodid gemessen und die Daten mit Hilfe des Programmes "Cellquest" (Verity Software House) ausgewertet.

8.2.5 BrdU-PI-FACS-Analyse des DNA-Gehaltes von Zellen

Zur Analyse des Zellzyklusprofils wurde der DNA-Gehalt einer Zellpopulation in der Durchflusszytometrie bestimmt. Um eine genaue Trennung zwischen G1/G2- und S-Phase zu erzielen, wurden die Zellen eine Stunde vor der Ernte mit 20µM BrdU (Bromdesoxyuridin) inkubiert, welches während der Synthesephase in die DNA eingebaut wird. (Für die FACS-Einstellung wurde eine Kontrollzellplatte ohne inkubiertem BrdU verwendet.) Die Ernte und Fixierung erfolgten wie unter 8.2.4 beschrieben. Die Zellen wurden anschließend abzentrifugiert und erneut mit PBS gewaschen. Das Zellpellet wurde in 1ml 2M HCl / 0.5% TritonX-100 zur Zellmembran-Permeabilisierung resuspendiert und für 30Min bei RT inkubiert. Nach einer weiteren Zentrifugation wurde das Pellet in 1ml 0,1M Na₂B₄O₇ resuspendiert (HCl-Inaktivierung) und die Zellzahl bestimmt. Die Zellen wurden im Verhältnis 1×10^6 Zellen : 20µl anti-BrdU-FITC-Antikörper : 100µl 1% BSA / 0.5% Tween20 / PBS für 30Min bei RT im Dunkeln inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen mit 1% BSA / 0.5% Tween20 / PBS gewaschen und anschließend im Verhältnis 1×10^6 Zellen : 400µl Natriumcitrat : 1µl RNaseA : 15µl Propidiumiodid für 1h bei 37°C inkubiert. Die Messung in FACS-Röhrchen erfolgte im FL2-A (lin)-Kanal für Propidiumiodid und im FL1-H (log)-Kanal für BrdU. Die Daten wurden mit Hilfe des Programmes "Cellquest" (Verity Software House) ausgewertet.

8.2.6 Lebend-GFP-FACS-Analyse

Die Lebend-GFP-FACS-Analyse wurde mit Zellen durchgeführt, die mit dem Vektor pRetro-super-GFP infiziert worden waren. Ziel dieses Experimentes war es, den prozentualen Anteil der GFP positiven Zellen an der Gesamtzellzahl zu bestimmen. Die Intensität des von dem Vektor pRetrosuper-GFP exprimierten GFP war sehr schwach, so dass die Zellen nicht fixiert werden konnten. Daher wurde das GFP-Signal direkt nach der Zellernte (Überstand und Zellen) in der Durchflusszytometrie im FL1-H (log)-Kanal gemessen. Für die Einstellungen dienten nicht GFP markierte Zellen als Negativkontrolle sowie mit dem Konstrukt pBabe-H2BGFP infizierte Zellen als Positivkontrolle. Die Daten wurden mit Hilfe des Programmes "Cellquest" (Verity Software House) ausgewertet.

8.2.7 Lebend-PI-FACS-Analyse

Die Anfärbung unfixierter Zellen mit Propidiumiodid diente der Unterscheidung von lebenden (Propidiumiodid negativ) und apoptotischen Zellen (Propidiumiodid positiv). Direkt nach der Zellernte (Überstand und Zellen) wurde die Zellzahl bestimmt. Die Zellen wurden anschließend im Verhältnis 1×10^6 Zellen : $1 \mu\text{l}$ Propidiumiodid : $500 \mu\text{l}$ PBS im Dunkeln für 15Min inkubiert. Das Propidiumiodidsignal wurde anschließend im FL2-A (lin)-Kanal gemessen. Als Positivkontrolle diente eine mit UVB bestrahlte Zellprobe. Die Daten wurden mit Hilfe des Programmes "Cellquest" (Verity Software House) ausgewertet.

8.2.8 Immunofluoreszenz

Diese Methode diente dazu, Proteine in fixierten Zellen mit Hilfe eines an ein Detektionssystem gekoppelten Antikörpers anzufärben. Auf diese Weise konnte bestimmt werden, in welchem Kompartiment der Zelle sich das zu untersuchende Protein befand. Hierzu wurden Ø 6cm Schalen mit runden Deckgläsern ausgelegt und $2,5 \times 10^5$ Zellen darauf ausplattiert. Diese wurden nach 36h in Paraformaldehyd fixiert. Hierzu wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 1%igem Paraformaldehyd für 15Min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 1%igem CHAPS für 15Min bei RT permeabilisiert. Die Zellen wurden mit MBS gewaschen und konnten optional bei 4°C für einige Tage aufbewahrt werden. Vor Inkubation mit dem Antikörper wurden die Zellen mit 20%igem in MBST gelöstem NGS für 1h bei Raumtemperatur zwecks Blockierung unspezifischer Bindungsstellen inkubiert und anschließend mit MBST gewaschen. Die Inkubation mit Antikörper fand in einer abgedunkelten feuchten Kammer statt. In die Schale wurde Parafilm geklebt, auf den $18 \mu\text{l}$ in MBS verdünnt-

ter Antikörper getropft und das Deckglas mit Zellseite nach unten darauf gelegt wurde. Die Inkubationsdauer betrug 2h bei RT. Hiernach wurden die Zellen dreimal für 5Min mit MBST gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit an Fluorochrom gekoppeltem Sekundärantikörper für 2h bei RT in 5% NGS-MBS. Im Anschluss wurden die Zellen erneut dreimal mit MBST für 5Min gewaschen. Die Anfärbung der DNA erfolgte mit Hoechst 33258 in MBST für 10Min bei RT. Nach einem erneuten dreimaligen Waschschriff mit MBST wurden die Zellen kurz mit Wasser gewaschen und die Deckgläser auf Objektträgern mit Mowiol eingedeckelt und mit Nagellack fixiert. Die Objektträger wurden im Dunkeln bei 4°C gelagert. Die Analyse erfolgte an einem Fluoreszenzmikroskop (Axioskop2, Zeiss). Digital aufgenommene Bilder wurden mit dem Programm IPlab (BD Biosciences) bearbeitet.

8.3 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN

8.3.1 Schneiden von DNA mit Restriktionsenzymen

Die Restriktion von Plasmid-DNA erfolgte mit Restriktionsendonukleasen (REs).

Reaktionsansatz:	xµg Plasmid-DNA
	1/10 Vol 10x Restriktionspuffer
	xµl Restriktionsendonuklease
	xµl dH ₂ O
	<hr/>
	Endvolumen 20-50µl

Die Reaktion erfolgte in der Regel für 2h bei 37°C.

Für eine „blunt end“-Klonierung, bei der ein 5'Überhang zunächst mit Klenow-Enzym aufgefüllt werden musste, wurden Insert und Vektor zunächst mit den jeweiligen REs inkubiert. Die REs wurden bei 85°C, 10Min inaktiviert. Zu dem Ansatz wurden 0,1mM dNTPs, 5mM DTT und 1U Klenow-Enzym hinzugegeben, für 1h, 37°C inkubiert und bei 85°C, 10Min inaktiviert.

Für die Klonierung von shRNA wurden 3µg sense-Oligonukleotide und 3µg antisense-Oligonukleotide zunächst mit 2x Annealing-Puffer und Aqua bidest auf ein Gesamtvolumen von 50µl verdünnt, zur Aneinanderlagerung für 5Min bei 95°C aufgekocht und langsam abgekühlt.

8.3.2 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten

Der Agarosegehalt der Gele lag zwischen 1% und 2% (w/v). Die Agarose wurde in 1x TAE-Puffer aufgekocht und nach Abkühlung auf 65°C zusammen mit Ethidiumbromid in die entsprechenden horizontalen Gelbetten gegossen. Als Laufpuffer diente 1x TAE-Puffer. Nach

der gelelektrophoretischen Auftrennung wurden die Gele zur Dokumentation unter UV-Licht (320nm) photographiert.

8.3.3 Aufreinigung von DNA-Fragmenten

Die Aufreinigung von DNA-Fragmenten nach Isolierung aus Agarosegelen bzw. direkt nach Verdau oder Amplifikation erfolgte mit dem QIAquick-Extraktionskit (QIAGEN) nach Angaben des Herstellers.

8.3.4 Ligation

Vor Beginn der Ligation wurde der DNA-Gehalt von Vektor und Insert auf Agarosegel abgeschätzt.

Ligationsansatz:	1µl Vektor (je nach Bandenintensität unterschiedlich verdünnt)
	5µl Insert
	2µl 10x Ligationspuffer
	1µl Ligase (1:10 verdünnt mit Verdünnungspuffer)
	<hr/> 20µl Endvolumen

Die Ligation erfolgte ü.N. bei 16°C.

8.3.5 Transformation von Bakterien durch Hitzeschock

Transformationskompetente Bakterien wurden auf Eis aufgetaut und das zur Transformation vorgesehene Plasmid (1µg) bzw. der Ligationsansatz (10-20µl) zu 1ml Bakteriensuspension gegeben und für 20Min auf Eis inkubiert. Die Transformation erfolgte bei 42°C (Wasserbad) für 45Sek. Nach 2Min Inkubationszeit auf Eis wurden die Bakterien in 600µl Antibiotika freiem LB-Medium zwischen 30Min und 45Min bei 700rpm, 37°C inkubiert und anschließend auf Antibiotika-haltigen LB-Agarplatten (Ampicillin oder Kanamycin) ausgestrichen und ü.N. in einem Brutschrank, 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden Klone gepickt und diese entweder für eine Minipräparation in 3ml Antibiotika-haltigem LB-Medium in einem Schüttler bei 200rpm, 37°C ü.N. inkubiert oder für eine Maxipräparation über eine Vorkultur in eine Antibiotika-haltige LB-Flüssigkultur (250ml) überführt.

8.3.6 Minipräparation von Plasmid-DNA aus Bakterien

1ml einer Übernachtskultur von transformierten E. coli Bakterien wurde für 1Min bei 7000rpm, RT in einer Heraeus-Tischzentrifuge abzentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in

110µl STET-Puffer mit Lysozym (0,5mg/ml) aufgenommen, resuspendiert und für 5Min bei RT inkubiert. Danach wurde die Suspension für 1Min bei 95°C inkubiert und anschließend für 15Min bei 1200rpm, 4°C in einer Heraeus-Tischkühlzentrifuge abzentrifugiert. Die Plasmid-DNA befand sich im Überstand. Das Pellet wurde entfernt, der Überstand mit 110µl Isopropanol versetzt und erneut für 15Min bei 12000rpm, 4°C abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 300µl 70% (v/v) Ethanol gewaschen, getrocknet und in 25µl TE-Puffer aufgenommen.

8.3.7 Maxipräparation von Plasmid-DNA aus Bakterien

Um größere Mengen eines Plasmides zu erhalten, wurden 250ml einer E. coli-Übernachtskultur gemäß den Angaben des Herstellers (Jetstar) mit Hilfe des DNA-Maxikits verarbeitet. Die DNA wurde bei -20°C gelagert.

8.3.8 Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA

Die Bestimmung der Konzentration von DNA und RNA erfolgte bei einer Absorption von 260nm mit dem Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer, Kisker-biotech. Die Proben wurden anschließend auf 1µg/µl eingestellt.

8.3.9 RNA-Isolierung mit peqGOLD TriFast-Reagenz

Die Isolierung der RNA erfolgte mit dem peqGOLD TriFast-Reagenz gemäß den Angaben des Herstellers (Peqlab). Die RNA wurde bei -80°C gelagert.

8.3.10 RT-PCR

Die Methode der RT-PCR diente der Amplifikation von RNA. Für die Amplifikation war es notwendig, die RNA zunächst in DNA umzuschreiben, da die Ausgangs-RNA nicht direkt als Matrize von der Taq-Polymerase genutzt werden konnte. Mit Hilfe einer Reversen Transkriptase (RTase) wurde von der RNA ein komplementärer DNA-Strang gebildet. Diese copyDNA (cDNA) wurde dann in einem weiteren Schritt in einer normalen PCR oder einer qPCR amplifiziert (s.u.).

Protokoll für die c-DNA Synthese mit Random Primern:

2µg RNA wurden mit RNase-freiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 10µl aufgefüllt.

Nach 1Min Inkubation bei 65°C wurden zu der RNA ein Mastermix – bestehend aus 10µl 5x Superscriptpuffer, 5µl DTT (0,1M), 1,25µl dNTPs (10mM), 0,2µl RNasin, 2µl Random Pri-

mern, 1µl Reverser Transkriptase (M-MLV-RTase) und 16,8µl RNase-freiem Wasser – gegeben und für 15Min, 20°C; 50Min, 37°C und 5Min, 65°C inkubiert.

8.3.11 PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion wurde zur Amplifikation von cDNA und von DNA-Fragmenten mit definierten Eigenschaften, wie z.B. dem Anfügen bestimmter Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme eingesetzt. Das Prinzip beruht darauf, dass eine spezielle hitzebeständige DNA-Polymerase durch an spezifischen Stellen angelagerte Oligonukleotide (Primer) vorgegebene DNA-Abschnitte mit Hilfe der in dem Reaktionsgemisch beigefügten vier Desoxynukleosid-Triphosphate exponentiell amplifiziert.

Der PCR-Ansatz – bestehend aus 1µl cDNA, 3µl 10x Puffer, 1,5µl DMSO, 0,6µl 10mM dNTPs, 1,2µl 3'Primer, 1,2µl 5'Primer, 1,5µl Red Taq-Polymerase, 19µl Aqua bidest – wurde auf 94°C erhitzt, um die DNA-Doppelhelix in Einzelstränge zu zerlegen. Die Anlagerung der Primer erfolgte bei einer Annealing-Temperatur (Ta) von 50-60°C (entspricht Schmelztemperatur der Primer minus 5°C). Die Reaktion der Polymerase erfolgte bei 72°C. Die Reaktionszeit richtete sich nach der Länge der zu amplifizierenden DNA (Reaktionszeit der Polymerase ca. 1kb pro Min). Dieser Zyklus aus Denaturierung der DNA, Anlagerung der Primer und Reaktion der DNA-Polymerase wiederholte sich je nach eingesetzter DNA-Menge zwischen 27- und 35-mal. Zur Amplifikation von DNA-Fragmenten zwecks Klonierung wurde eine DNA-Polymerase mit Korrekturlese-Funktion eingesetzt (Reaktionszeit der Polymerase ca. 0,5kb pro Min). Die ersten beiden Zyklen fanden bei einer Anlagerungstemperatur von 40°C statt, da die Oligonukleotide für die Restriktionsenzymerkennungsstellen noch nicht vollständig binden konnten. Insgesamt wurden hier 40 Zyklen durchgeführt.

8.3.12 qPCR

Mittels quantitativer Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) konnte DNA quantifiziert werden. Bei einer optimalen Reaktion verdoppelt sich die Ausgangsmenge DNA während jedem Amplifikationszyklus. Bei der qPCR wird ein Fluoreszenzfarbstoff zur Detektion des Produktes eingesetzt. SYBR Green I ist ein solcher Farbstoff. Er kann an doppelsträngige DNA binden und dabei seine Fluoreszenzintensität gegenüber ungebundenem Farbstoff auf ein 1000faches erhöhen. In der exponentiellen Phase der Amplifikation ist die Fluoreszenzintensität demnach der Menge an DNA proportional. Die Echtzeit-qPCR misst das fluoreszierende Signal während jedem Amplifikationszyklus. Der erste Zyklus, bei dem das qPCR-Gerät zwi-

schen durch Amplifikation der DNA generierter Fluoreszenz und Hintergrundfluoreszenz unterscheidet, wird Schwellenwertzyklus (englisch: threshold cycle, Ct) genannt. Der Ct-Wert korreliert direkt zu der Menge an Ausgangs-DNA der zu untersuchenden Probe: Je größer die Menge an Ausgangs-DNA, desto früher wird der Ct der Probe erreicht und desto kleiner ist der Wert.

Im Detail wurde der PCR-Ansatz – bestehend aus 1µl cDNA, 10µl 2x Immomix (inklusive Puffer, dNTPs und Polymerase), 0,5µl 3'Primer, 0,5µl 5'Primer, 0,5µl SYBR Green I und 7,5µl Aqua bidest – in einem Zweischnitt-Programm für 40 Zyklen auf 95°C, 30Sek erhitzt (DNA-Doppelhelix wird in Einzelstränge zerlegt) und anschließend für 1Min bei 60°C inkubiert (Anlagerung der Primer und Polymerase-Reaktion). Die Experimente wurden in Triplikaten durchgeführt. Die zu vergleichenden Proben wurden auf einen gemeinsamen Ct-Wert des ubiquitär exprimierten Genes *β2-MIKROGLOBULIN* eingestellt. Die Expression des zu untersuchenden Genes (Mittelwert) wurde relativ zur Expression von *β2-MIKROGLOBULIN* (Mittelwert) nach der $\Delta\Delta CT$ relativen Quantifizierungsmethode berechnet. Zudem wurde hiervon die Standardabweichung bestimmt. Für die Auswertung der ChIP-Analyse wurde zunächst für jedes Triplikat einzeln der prozentuale DNA-Anteil nach IP im Vergleich zum Input nach der Formel $(1/\text{Verdünnungsfaktor Input} \cdot (1/2^{\Delta Ct}) \cdot 100\%)$ berechnet und anschließend der Mittelwert bestimmt. Der *delta* Ct-Wert ergibt sich hierbei aus der Differenz zwischen Ct-Wert der einzelnen Probe nach IP und des Inputs.

8.4 BIOCHEMISCHE METHODEN

8.4.1 Herstellung von Proteinlysaten aus kultivierten Zellen

8.4.1.1 Ernten von Zellen

Zellen wurden entweder mechanisch mittels Zellscharber (Eis, PI-Cocktail) oder durch Trypsinisieren geerntet, anschließend abzentrifugiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert bzw. direkt aufgearbeitet.

8.4.1.2 Proteinextraktion nach der "Freeze & Thaw"-Methode

Je nach Größe des Zellpellets wurde dieses zum Zellaufschluss in 50µl bis 200µl NP40-Puffer mit 1/1000VT PI-Cocktail (frisch zugesetzt) resuspendiert und anschließend dreimal für je 3Min in flüssigem Stickstoff und je 3Min bei 37°C inkubiert. Um die Proteine von den restlichen Zellbestandteilen zu trennen, wurde die Suspension für 15Min bei 13.000rpm, 4°C in einer Heraeus-Tischkühlzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand, in dem sich die Proteine be-

finden, wurde in ein neues 1,5ml Reaktionsgefäß überführt. Die Proteine wurden bei -80°C gelagert.

8.4.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration im Zelllysate wurde die von Bradford (1976) beschriebene Methode verwendet.

8.4.3 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von Proteinen aus Zelllysaten erfolgte durch diskontinuierliche SDS-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) (Laemmli UK, 1970) unter denaturierenden Bedingungen. SDS denaturiert die Proteine und geht nicht-kovalente Wechselwirkungen mit hydrophoben Bereichen ein. Dabei ist das Verhältnis von SDS-Molekülen pro Aminosäure annähernd konstant. Durch die komplette Entfaltung und den Besatz mit SDS werden Ladungsunterschiede zwischen den einzelnen Proteinen ausgeglichen; alle Proteine sind negativ geladen und wandern im elektrischen Feld zur Anode. Die Wanderung der Proteine hängt hierbei neben der Durchlässigkeit der Matrix nur noch vom Molekulargewicht der Proteine ab. Dabei wandern kleine Proteine schneller als größere.

Als Matrix dienten vertikale Gele aus mit Bisacrylamid vernetztem Acrylamid, die aus einem niedrigprozentigen Sammelgel und einem – je nach erwünschtem Auftrennungsgrad bzw. Größe des Proteins – 7,5 bis 15 prozentigem Trenngel bestanden. Die Pufferbedingung im Sammelgel gewährleistete das Entstehen einer einheitlichen Proteinfront, diejenige im Trenngel sorgte für eine optimale Auftrennung der Proteine. Trenn- und Sammelgel wurden durch Mischen von Acrylamidstammllösung (30% (v/v)) mit dem jeweiligen Gelpuffer im erforderlichen Verhältnis (im Sammelgel 5% (v/v) Acrylamid) hergestellt. (Die Polymerisation des Gels ist eine Radikalkettenreaktion, die durch den Zerfall von Peroxidsulfationen (APS 10% (w/v)) eingeleitet wird. Die Radikale aktivieren in einem zweiten Schritt Tetramethylethyldiaminmoleküle (TEMED 0,08%), deren Radikale die eigentlichen Initiatoren der Radikalkettenpolymerisation sind.) Die aufzutrennende Proteinlösung wurde jeweils mit 1/2 VT 3x SDS-Probenpuffer versetzt, für 5Min bei 95°C inkubiert. Bei Verwendung von Minigelen (Bio-Rad) ließ man die Proben bei 80V in das Sammelgel einlaufen. Die Proteinauftrennung erfolgte im Trenngel bei 120V. Die Laufzeit war abhängig von dem gewünschten Auftrennungsgrad, der anhand des mitlaufenden Größenstandards nachvollzogen werden konnte. Größenunterschiede von 1kDa (entspricht ca. 10 Aminosäuren) konnten mit dieser Methode

aufgelöst werden. Die aufgetrennten Proteinbanden wurden mittels Western-Blot-Analyse sichtbar gemacht. Als Pufferlösung diente 1x SDS-Laufpuffer.

8.4.4 Western-Blotting

Mit dieser Methode erfolgte der Nachweis der durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine mit Hilfe von spezifischen Antikörpern. Im ersten Schritt ließ man die Proteine durch ein transversal zur Oberfläche des Gels angelegtes elektrisches Feld auf der anodischen Seite aus dem Gel austreten und transferierte sie auf eine PVDF-Membran. Dort nahmen die Proteine genau die Position ein, die sie im Gel belegten. Die auf der Oberfläche der Membran immobilisierten Proteine waren nun immunologischen Reaktionen zugänglich.

Dazu wurde die Membran in einer Lösung, die gegen das nachzuweisende Protein gerichtete Antikörper enthielt, inkubiert. Ein Zweitantikörper, der gegen die konstanten Domänen der schweren Kette des Erstantikörpers gerichtet war, wurde hinzugegeben. Dieser Zweitantikörper war mit einer Meerrettich-Peroxidase gekoppelt. Dessen Enzymreaktion erlaubte den hochspezifischen Nachweis des erwünschten Proteines. Im Detail wurde die Membran zunächst vorbehandelt, hierzu für 1Min in 100% Methanol, für 2Min in Aqua bidest und für 5Min in 1xBlotpuffer inkubiert. Der elektrophoretische Transfer der Proteine wurde in einer "semi-dry" Blotapparatur (Bio-Rad) vorgenommen. Drei Whatman-3M-Papiere, jeweils so groß wie die PVDF-Membran, wurden in Blotpuffer getränkt und luftblasenfrei übereinander auf die Anode der Blotapparatur gelegt. Darauf wurden die vorbehandelte PVDF-Membran, das Polyacrylamidgel und nochmals drei in Blotpuffer getränkte Whatman-3M-Papiere gelegt. Der Proteintransfer auf die Membran erfolgte je nach Oberfläche der Membran bei einer konstanten Spannung von 200mA ($200\text{mA}/\text{Fläche der Membran cm}^2 = x \text{ Min Blotzeit}$, s. Broschüre Millipore-Membran). Um unspezifische Antikörperbindungen an die Nitrozellulose-Membran zu vermeiden, wurde diese zum Absättigen nach dem Blotten in Blocklösung für 2h bei RT oder über Nacht im Kühlraum inkubiert. Anschließend wurde die Membran mit dem primären Antikörper in der gewünschten Konzentration in frischer Blocklösung inkubiert (2h, RT; über Nacht, 4°C). Die Membran wurde nun dreimal für 10Min in TBST-Puffer gewaschen. Der sekundäre, Meerrettich-Peroxidase konjugierte Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1:3000 in Blocklösung zu der Membran gegeben und für 1,5h inkubiert. Danach wurde diese erneut mit TBST-Puffer gewaschen. Die Membran wurde mit Hilfe von Reagenzien (Amersham, Milipore) entwickelt, welche zusammen mit der Meerrettich-Peroxidase eine Chemilumineszenz erzeugten, die sich mit geeigneten Filmen nachweisen ließ. Die

Membran wurde zur Exposition in Klarsichtfolie verpackt. Die Expositionszeit auf dem ECL-Hyperfilm erfolgte je nach Signalstärke zwischen 1Sek und 2h. Die Schwärzung des Filmes war in gewissen Grenzen der Menge an gebundenem Antikörper und damit der Menge an nachzuweisendem Protein proportional.

8.4.5 Nuklearextrakt

Die nukleäre Extraktion erfolgte mit 4×10^7 Zellen (2x15cm Schalen). Nach der Zellernte und einem Waschschrift mit kaltem PBS wurden die Zellen in 1ml Puffer A resuspendiert und in ein 1,5ml Eppi überführt und für 20Min auf Eis inkubiert. Danach wurde das Eppi 20Sek lang gevortext und bei 4000rpm, 4°C für 5Min abzentrifugiert. Im Überstand befand sich der zytoplasmatische Zellanteil sowie nicht chromatingebundene nukleäre Proteine. Je nach Fragestellung wurde dieser in einem separaten Eppi aufbewahrt oder verworfen. Das Zellpellet, welches den chromatinhaltigen nukleären Zellanteil mit chromatingebundenen Proteinen enthielt, wurde in 180µl Puffer B resuspendiert. Nach einer 20Min Inkubation bei 4°C unter Rotation wurde das Lysat bei 14.000rpm für 8Min bei 4°C abzentrifugiert. Der Überstand enthielt den Nuklearextrakt mit chromatingebundenen Proteinen. Dieser konnte schockgefroren und bei -80°C gelagert werden oder direkt für eine Western-Blot-Analyse oder Immunopräzipitation verwendet werden.

8.4.6 Native Chromatinisolierung

Mit dieser Methode wurde untersucht, ob ein bestimmtes Protein in der Zelle chromatinassoziiert vorliegt. Für die Aufreinigung wurden 8×10^7 Zellen benötigt (4x15cm Schalen). Diese wurden geerntet und in mit 0,1% NP40 versetztem Puffer A für 5Min auf Eis lysiert. Der nukleäre Anteil wurde bei 2800rpm für 5Min bei 4°C abzentrifugiert und der Überstand (S1) in ein neues Eppi überführt. S1 wurde nochmals bei 14000rpm für 20Min bei 4°C zentrifugiert und der Überstand (S2) gewonnen, in dem sich die löslichen zytoplasmatischen Proteine befanden. Die Zellkerne aus dem ersten Zentrifugationsschritt wurden in 1ml Puffer A gewaschen und erneut bei 2800rpm für 5Min bei 4°C abzentrifugiert. Das Pellet wurde nun zweigeteilt. Der eine Teil wurde mit Mikrokokkus Nuklease behandelt, der andere Teil blieb unbehandelt. Der zu behandelnde Teil wurde in auf 37°C vorgewärmten Puffer A resuspendiert und mit 0,3U Mikrokokkus Nuklease sowie 1mM CaCl_2 versetzt und für 2Min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde mit 1mM EGTA abgestoppt. Der andere Teil wurde mit Puffer A auf Eis inkubiert. Beide Eppis wurden bei 2800rpm für 5Min bei 4°C abzentrifugiert. Die

Nuklei wurden in 1ml Puffer B für 30Min auf Eis lysiert und erneut bei 2800rpm für 5Min bei 4°C abzentrifugiert. Die Überstände (S3+ und S3-) wurden gewonnen. In den Pellets war das Chromatin angereichert. Diese wurden in 1ml Sonifizierungspuffer resuspendiert und mit einem Ultraschallstab für 2x10Sek, 10% Amplitude, 30Sek Pause sonifiziert. Die Überstände (P3+ und P3-) wurden nach Zentrifugation bei 2800rpm für 5Min bei 4°C gewonnen. Der Proteingehalt der einzelnen Fraktionen wurde photometrisch bestimmt und gleiche Proteinmengen der Proben S2, S3+, S3-, P3+, P3- auf Gel aufgetragen. In einer Western-Blot-Analyse wurde bestimmt, in welchen Fraktionen sich das zu untersuchende Protein befand.

8.4.7 Co-Immunopräzipitation

Diese Methode diente der Interaktionsstudie von Proteinen. Die zu untersuchenden Proteine wurden zunächst an ihren jeweils spezifischen Antikörper gekoppelt. Dieser band in einem zweiten Schritt an Sepharose A oder G gekoppelte Beads (abhängig von Wirt und IgG-Isotyp des Antikörpers). Mittels Western-Blot-Analyse wurde überprüft, ob an das immunopräzipitierte Protein das zweite zu untersuchende Protein gebunden hatte. Für die Co-IP von exogenen Proteinen wurden zunächst HEK-293-Zellen mit den entsprechenden Konstrukten transfiziert (s. 8.2.1). 40h bis 48h nach Transfektion wurden die Zellen geerntet und in 1ml IPH-Puffer lysiert. Die Zellsuspension wurde anschließend in einem 15ml Falcon-Röhrchen mit einem Ultraschallstab bei 4°C sonifiziert (2x20Sek, 20% Amplitude, 30Sek Pause) und in einem Über-Kopf-Schüttler für 20Min bei 4°C inkubiert. Nach einer Zentrifugation bei 13000rpm, 15Min, 4°C wurde der Proteingehalt des Überstandes anhand der Bradford-Lösung photometrisch bestimmt. Für die endogene Co-IP wurde ein Nuklearextrakt aus LS174T-Zellen hergestellt (s. 8.4.5): Die nukleären chromatin-assoziierten Proteine befanden sich im Puffer B. Dieser enthielt jedoch eine für die Immunopräzipitation zu hohe Salzkonzentration von 400mM NaCl. Das einzusetzende Proteinvolumen wurde daher in einem NaCl-freien IPH-Puffer auf eine finale Konzentration von 150mM NaCl verdünnt. Für die Immunopräzipitation exogener Proteine wurden 150-250µg Lysat, für die IP endogener Proteine 500µg Lysat eingesetzt. Für den Input wurden in der Regel 5% bis 10% des Lysates entnommen und später auf Gel aufgetragen. Für die Vorinkubation der Beads mit Lysat wurden 10µl Beads, für die Kopplung an Antikörper und Lysat jeweils 20µl Beads eines 50:50-Gemisches aus Beads und IPH-Puffer eingesetzt. Alle nachfolgenden Zentrifugationsschritte erfolgten bei 3000rpm, 1Min, 4°C, alle Inkubationsschritte mit einem Über-Kopf-Schüttlers bei 4°C. Um

unspezifische Bindungen zwischen Beads und Protein zu vermeiden, wurden die dreimal in IPH-Puffer gewaschenen Beads zunächst mit 200µg/ml BSA in IPH-Puffer für 1h inkubiert. Im nächsten Schritt wurde das einzusetzende Lysat mit den geblockten Beads für 1h inkubiert, um später unspezifische Bindungen des Lysates an die Beads zu vermeiden. Die Immunopräzipitation erfolgte über Nacht: Das Lysat wurde mit 1µg Antikörper in einem Gesamtvolumen von 200µl (IPH-Puffer) inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Beads hinzugegeben und das Gemisch für weitere 2h inkubiert. Im Anschluss wurden die Beads fünfmal mit 1ml IPH-Puffer für mindestens 5Min gewaschen. Die trockenen Beads wurden mit 40µl 1,5xSDS-Probenpuffer für 5Min bei 95°C inkubiert und bei -80°C gelagert. Die Proteinanalyse erfolgte mittels Western-Blot-Analyse. Hierzu wurden Input sowie 10µl des aufgekochten Probenpuffers für die Analyse exogener und 20µl für die Analyse endogener Proteine auf Gel aufgetragen.

8.4.8 Chromatinimmunopräzipitation (ChIP)

Anhand dieser Methode konnte untersucht werden, ob ein bestimmtes Protein an eine bestimmte DNA-Sequenz *in vivo* gebunden hatte. Dazu wurden mit Formaldehyd die Interaktionen von Proteinen untereinander und mit der DNA fixiert. Die DNA wurde in kleine Stücke mittels Ultraschall geschnitten. Im nächsten Schritt erfolgte über an Beads gekoppeltem spezifischen Antikörper eine Immunopräzipitation des zu untersuchenden Proteins. Durch die Fixierung mit Formaldehyd waren Protein und DNA weiterhin aneinander gebunden. In einem weiteren Schritt wurde die DNA von dem Protein gelöst und aufgereinigt. Im letzten Schritt wurde die DNA mittels PCR mit sequenzspezifischen Primern amplifiziert, um zu überprüfen, ob das zu untersuchende Protein tatsächlich an der zu untersuchenden DNA-Sequenz gebunden hatte. Insgesamt wurden zwei Kontrollen durchgeführt, um unspezifische Bindungen auszuschließen. Zum einen erfolgte die Immunopräzipitation mit einem Kontrollantikörper, zum anderen die PCR mit Primern, welche an eine Kontrollregion banden. Die amplifizierte DNA nach der IP wurde als prozentualer Anteil der amplifizierten Input-DNA dargestellt.

Schritt 1: Isolierung des Chromatins

Pro Immunopräzipitation wurden Zellen einer 80% konfluenten Ø 15cm Zellkulturschale geerntet. Hierbei wurde zu dem Zellkulturmedium 1% Formaldehyd hinzugegeben und für 10Min bei 37°C, anschließend mit 0,125M Glycin für 10Min bei 37°C inkubiert, um das Formaldehyd zu neutralisieren. Die Zellen wurden zweimal mit kaltem PBS gewaschen und mechanisch auf Eis geerntet, in

einem 15ml Falcon-Röhrchen gesammelt und anschließend bei 1200rpm für 15Min bei 4°C abzentrifugiert. Das Pellet wurde in Lysepuffer I (0,5ml Puffer I pro Schale) resuspendiert und 3h im Über-Kopf-Schüttler bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde je 1ml Lysat 8x gedounct. Nach einem Zentrifugationsschritt bei 1200rpm für 5Min bei 4°C wurde das Zellpellet in Lysepuffer II (RIPA-Puffer, 0,5ml pro Schale) resuspendiert und für 10Min auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurde das Chromatin mit einem Ultraschallstab auf eine DNA-Länge von 200bp bis 1kb kleingeschnitten. (Einstellung: 10x5Sek, 20% Amplitude, 20Sek Pause). Hierbei wurde das Lysat mit einem Ethanol-Eis-Gemisch gekühlt. Das Lysat wurde in 1,5ml Eppis überführt und bei 13000rpm für 15Min bei 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde in einem neuen Gefäß gesammelt und konnte ggf. schockgefroren und bei -80°C gelagert werden. Zuvor wurden 100µl des Lysates für die Revertierung zur Überprüfung der Effizienz der Ultraschallbehandlung entnommen.

Schritt 2: Revertierung zur Überprüfung des kleingeschnittenen Chromatins

100µl Lysat wurden mit 20µg Proteinase K und 10µg RNase A gemischt, mit 50µl Mineralöl überschichtet und 3h bei 55°C sowie ü.N. bei 65°C inkubiert. Die DNA wurde mittels QIAGEN Aufreinigungskit aufgereinigt und in 50µl EB Puffer eluiert. Auf einem 1%igem Agarosegel wurden nebeneinander 10µl und 30µl DNA aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Die mit Ethidiumbromid angefärbten Banden lagen im Bereich zwischen 200bp und 1kb.

Schritt 3: Blockieren der Sepharose Beads

Protein A oder G gekoppelte Sepharose Beads wurden in RIPA-Puffer gewaschen und später als Gemisch bestehend aus 50% Beads und 50% RIPA-Puffer eingesetzt. Pro IP wurden 120µl Beads eingesetzt: 60µl Beads für die Vorreinigung des Chromatins, um unspezifische Chromatin-Beads-Bindungen auszuschließen, und 60µl Beads für die eigentliche IP. Je nach Gesamtvolumen der Beads wurden diese in 5ml RIPA-Puffer resuspendiert, dem zum Blocken 1mg/ml BSA, 400µg/ml sonifizierte Lachssperma-DNA sowie PI-Cocktail hinzugefügt wurde. Dieses Gemisch wurde ü.N. bei 4°C rotiert.

Schritt 4: „Preclearing“ des Chromatins

Das für die IPs benötigte Chromatin wurde nun mit der Hälfte der geblockten Beads (Protein A oder Protein G gekoppelt) 3h bis 6h oder ü.N. unter Rotation inkubiert.

Schritt 5: Immunopräzipitation

Das Chromatin-Beads-Gemisch wurde bei 2000rpm für 5Min bei 4°C zentrifugiert. Das Chromatin wurde von den Beads separiert. 100µl Chromatin wurden als Inputkontrolle (1/10 des in der IP

eingesetzten Chromatins) entnommen und bei 4°C gelagert. Das restliche Chromatin wurde auf zwei 1,5ml Eppis aufgeteilt. Zu dem einen Eppi wurden 5µg spezifischer Antikörper und zu dem anderen Eppi Kontrollantikörper derselben Spezies und desselben IgG-Isotypes hinzugegeben und ü.N. bei 4°C unter Rotation inkubiert. Danach wurden pro IP 60µl der geblockten Beads zu dem Gemisch aus Antikörper und Chromatin für weitere 2h bis 6h bei 4°C unter Rotation hinzugegeben.

Schritt 6: Waschen der Beads

Das Gemisch wurde bei 3000rpm für 5Min bei 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Beads wurden nun mit je 1ml folgender Puffer gewaschen: 2x Waschpuffer I, 3x Waschpuffer II, 4x Waschpuffer III, 1x TE pH 8. Die einzelnen Waschschrte erfolgten bei 4°C unter Rotation für mindestens 5Min. Beim Wechseln der Waschpuffer wurden auch die Beads in neue 1,5ml Eppis überführt.

Schritt 7: Elution und Revertierung der DNA von den Proteinen und RNase-Verdau

Die Proben (IP und Input) wurden in TE-Puffer mit 0,5% SDS, 0,05µg/µl Proteinase K, 0,05µg/µl RNase A versetzt, mit 50µl Mineralöl überschichtet und 3h bei 55°C, anschließend ü.N. bei 65°C inkubiert.

Schritt 8: Aufreinigen der DNA

Die DNA aus IP und Input wurde in ein neues Eppi überführt und nach dem QIAGEN-Säulen-Aufreinigungsprotokoll aufgereinigt. Die Elution fand in 50µl Aqua bidest, pH 8 statt. Das Chromatin wurde bei 4°C gelagert.

Schritt 9: PCR

Die DNA aus IP und Input wurde mit sequenzspezifischen bzw. Kontrollprimern in einer Echtzeit-qPCR amplifiziert. Die amplifizierte DNA nach der IP wurde als prozentualer Anteil der amplifizierten Input-DNA dargestellt.

8.4.9 Oligonukleotid-Pulldown

Diese Methode diente der In-vitro-Interaktionsstudie von Proteinen an sequenzspezifische Oligonukleotide. Zunächst wurden die biotinylierten Oligonukleotide (sequenzspezifische und Kontrollnukleotide) mit Annealing-Puffer komplementär aneinander gebunden. Hierzu wurde Wasser auf 100°C erhitzt und der Reaktionsansatz (bestehend aus 50µg sense-Oligonukleotiden, 50µg antisense-Oligonukleotiden, 10x Annealing-Puffer in einem Gesamtvolumen von

100µl in Aqua bidest) für 5Min aufgeköcht und anschließend langsam abgekühlt. Die Bindung der sense- und antisense-Oligonukleotide wurde in einem nicht-denaturierendem Polyacrylamidgel überprüft. Hierzu wurden 1µl der einzelnen Oligonukleotide sowie 0,5µl der annealten Oligonukleotide nebeneinander mit DNA-Probenpuffer auf Gel aufgetragen und mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel in Ethidiumbromid für 10Min gefärbt, in 0,5xTBE Puffer für 10Min entfärbt und unter UV-Licht analysiert. Die Zellen wurden mit den entsprechenden Expressionskonstrukten transfiziert, geerntet, in 0,5ml HKMG-Puffer lysiert und mit einem Ultraschallstab für 2x20Sek, 20% Amplitude, 30Sek Pause sonifiziert. Anschließend wurde die Suspension auf einem Über-Kopf-Schüttler für 20Min bei 4°C inkubiert und danach bei 13000rpm für 15Min bei 4°C abzentrifugiert. Der Proteingehalt des Überstandes wurde mit Bradford-Lösung photometrisch bestimmt. Für den Pulldown wurden 100µg bis 200µg Protein eingesetzt. 5% bis 10% des Proteingehaltes wurden für den Input eingesetzt. Alle folgenden Zentrifugationsschritte fanden bei 3000rpm für 5Min bei 4°C statt. Alle Inkubationsschritte fanden auf einem Über-Kopf-Schüttler bei 4°C statt. Für den Pulldown wurde Streptavidin-Agarose eingesetzt. Die Streptavidin-Agarose wurde zunächst dreimal mit HKMG-Puffer gewaschen. Anschließend wurde die einzusetzende Proteinmenge mit Streptavidin-Agarose für 1h vorinkubiert, um unspezifische Protein-Streptavidin-Agarose-Bindungen zu minimieren. Das vorinkubierte Lysat wurde hiernach über Nacht mit 2µg annealten biotinylierten Oligonukleotiden, 0,5µg Lachssperma-DNA (Kompetitor-DNA) und 10µM ZnCl₂ (fördert die DNA-Bindung von Zinkfinger-Proteinen) in einem Gesamtvolumen von 200µl mit HKMG-Puffer inkubiert. Am nächsten Tag wurden 20µl Streptavidin-Agarose hinzugefügt und erneut für 1,5h inkubiert. Streptavidin band hierbei an Biotin der biotinylierten Oligonukleotide. Die Beads wurden anschließend viermal mit HKMG-Puffer für mindestens 5Min gewaschen. Der letzte Waschschrift erfolgte in HKMG-Puffer ohne Glycerol. Zu den trockenen Beads wurden 40µl 1,5xSDS-Probenpuffer hinzugegeben und das Gemisch bei 95°C für 5Min aufgeköcht. Der Input und 10µl des Pulldowns wurden auf Gel aufgetragen und Proteinbindung an die Oligonukleotide mittels Western-Blot-Technik analysiert.

8.4.10 Reporter-Assay

Dieser Assay wurde in Triplikaten durchgeführt. 1×10^5 SH-EP-Zellen oder 2×10^5 HEK-293-Zellen wurden ein Tag vor Transfektion in DMEM-Vollmedium auf Ø 6cm Zellkultur-

schalen ausplattiert. Die Transfektion wurde nach dem Kalzium-Phosphat-Protokoll durchgeführt. Hierbei wurden Expressionskonstrukte für Promotor (3µg), Transkriptionsfaktoren (5µg) und LacZ (für βGal-Assay, interner Standard) (0,5µg) eingesetzt. 48h nach Transfektion wurden die Zellen geerntet. Die Pellets wurden in 200µl Kpi-Puffer lysiert und nach dem Freeze and Thaw-Protokoll aufbearbeitet (s. 8.4.1.2). Die Protein-haltigen Überstände wurden in neue Eppis überführt. Anschließend wurden 50µl Lysat bzw. Kpi-Puffer (Hintergrund) mit 350µl ATP-Lösung in für die Messung im Luminometer geeigneten Röhrchen gemischt. Auch die Luziferin-Lösung wurde frisch angesetzt und im Dunkeln aufbewahrt. Die Luziferase-Aktivität wurde im Autolumat Plus LB 953 von Berthold nach Angaben des Herstellers gemessen. Die Luziferasewerte wurden entweder auf Messwerte des βGal-Assays oder auf Gesamtprotein normalisiert. Hierzu wurde der Proteingehalt von 5µl Lysat photometrisch bestimmt (Bradford). Für den βGal-Assay wurden 50µl Zellextrakt mit 750µl βGal-Puffer und 100µl ONPG in einer Plastikkuvette gemischt und bei 37°C zwischen 10Min und 8h inkubiert. Sobald ein gelber Farbumschlag auftrat, wurden die Proben photometrisch bei 420nm gemessen.

8.4.11 cDNA-Microarray

Die Microarray-Technologie bietet die Möglichkeit, das Expressionsmuster (Transkriptom) von einzelnen Zellen, einer Zellpopulation oder Gewebeproben für eine Vielzahl von Genen zu erfassen und miteinander zu vergleichen. Ein Microarray basiert auf einem Träger (z.B. ein Objektträger aus Glas), auf welchem eine große Anzahl von cDNA-Klonen oder Oligonukleotiden aufgebracht sind. Zur Erfassung des Transkriptoms muss zunächst die Gesamt-RNA aus den zu untersuchenden Proben isoliert und in cDNA umgeschrieben werden. Die cDNA der Probe bzw. der Referenz wird anschließend mit zwei verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen, z.B. Cy3 und Cy5 markiert, miteinander gemischt und auf dem Microarray-Objektträger hybridisiert. Mit Hilfe eines Fluoreszenzscanners kann im Anschluss das Fluoreszenzmuster visualisiert und dokumentiert werden. Mit der Software ScanArray (Perkin Elmer) können die unterschiedlichen Fluoreszenzintensitäten der Probe und der Referenz quantifiziert, miteinander verglichen und statistisch ausgewertet werden. Die Intensität der Fluoreszenz steigt proportional mit der Menge an Transkripten im Ausgangsmaterial an. Ist daher das Fluoreszenzsignal der Probe in einem bestimmten *Spot* stärker oder schwächer als das der Referenzprobe, so weist dies auf eine im Vergleich zur Referenz veränderte Expression des ent-

sprechenden Gens hin.

Das Microarray-Experiment wurde von der Arbeitsgruppe Dr. Michael Krause (Serviceeinheit Microarray) am Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung der Philipps-Universität Marburg (IMT) durchgeführt. Jeweils 2µg RNA wurden preamplifiziert (aRNA). Neben einer Vervielfachung der mRNA erzielte dies einen Aufreinigungseffekt. Die aRNA wurde unter Verwendung von Nona-Nukleotiden mit Zufallssequenz (Random Primer) in cDNA umgeschrieben und diese indirekt mit den Fluoreszenzfarbstoffen Cy3 und Cy5 markiert (CyScribe Post-Labeling Kit, Amersham Biosciences). Die fluoreszenzmarkierten cDNA-Proben (Sonden) wurden aufgereinigt (Qiagen PCR Purification Kit) und über Nacht jeweils zwischen zwei cDNA-Microarray Chips im Sandwich-Verfahren hybridisiert. Die Chips wurden von der Serviceeinheit Microarray angefertigt. Auf ihnen befanden sich 11.552 cDNA-Spots einer humanen cDNA-Library (Human Sequence-Verified cDNA UniGene Gene Sets gf200, gf201u and gf202, Invitrogen). Das Experiment wurde im Referenz-Design durchgeführt: Die Fluoreszenzintensität der vier eingesetzten Proben wurde jeweils mit der einer Misch-Referenz verglichen. Diese Referenz setzte sich aus einer gleichteiligen Mischung aller vier Proben zusammen und diente als Quervergleich. Die Daten wurden von Dipl. Biologin Birgit Samans (IMT, Marburg) ausgewertet. Für jeden Spot wurde der Median beider Fluoreszenzsignale und die entsprechende Hintergrundintensität ermittelt. Das auf den Hintergrund korrigierte Verhältnis beider Fluoreszenzintensitäten wurde berechnet und log₂ transformiert. Zum Ausgleich systematischer Fehler, z.B. die Unterschiede in den Fluoreszenzeigenschaften der beiden Farbstoffe, und um verschiedene Objektträger miteinander vergleichen zu können, wurden die Rohdaten wie in Yang IV et al., 2002 beschrieben normalisiert. Als differentiell exprimierte Gene wurden cDNA-Klone selektiert, die eine Expressionsänderung von mehr als 2fach haben.

9. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Ampère
Abb.	Abbildung
ad	aufzufüllen auf
AK	Antikörper
APS	Ammoniumperoxosulfat
Aqua bidest	destilliertes Wasser
ARF	<i>alternate open reading frame</i>
AS	Aminosäure
Ask1	<i>apoptosis signal regulating kinase 1</i>
ASPP	Ankyrin-repeat-, SH3-Domänen und Prolin-reiche Region enthaltene Proteine
ATM	<i>ataxia telangiectasia mutated</i>
ATP	Adenosintriphosphats
ATR	<i>ataxia telangiectasia and Rad3 related</i>
AT-RA	all-trans-Retinolsäure
α	anti
β Gal	beta-Galaktosidase
Bcl-6	B-Zell Lymphoma 6
bHLH	basisches Helix-Loop-Helix-Motiv
Bid	<i>BH3 interacting domain death agonist</i>
BMP	<i>bone morphogenetic protein</i>
bp	Basenpaar
BrdU	Bromdesoxy Uridin
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
BTB	<u>B</u> road-Komplex, <u>T</u> ramtrack und <u>B</u> ric à brac
Bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CDK	<i>cyclin dependent kinase</i>
cDNA	<i>copy DNA</i>

CHAPS	<i>3((3-Cholamidopropyl)dimethylammonio)-propanesulfonic acid</i>
CHD5	<i>chromo domain helicase DNA binding domain 5</i>
ChIP	Chromatinimmunopräzipitation
CIP	<i>CDK inhibitor protein</i>
CKI	<i>cyclin kinase inhibitor</i>
Cys	Cystein
C-Terminus	Carboxy-Terminus
DEPC	Diethylpyrokarbonat
DH5α	E. coli Klonierungsstamm
DMEM	Dulbecco's Modification of Eagle's Minimal Essential Medium (Zellkulturmedium)
CMV	Cytomegalovirus
CTD	C-terminale Domäne
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DH5α	E. coli Klonierungsstamm
DKK	Dickkopf
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
Dox	Doxycyclin
DTT	Dithiothreitol
EB	Eluationspuffer
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EGTA	Ethylendiamintetraacetat
Eph	<i>erythropoietin-producing hepatocellular carcinoma</i>
et al.	und andere
EtOH	Ethanol
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i> (Durchflusszytometrie)

FBS	<i>fetal bovine serum</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
g	Gramm
G1-Phase	Gap1-Phase
G2-Phase	Gap2-Phase
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
h	<i>hour</i>
HA	Haemagglutinin
HASH-1	<i>human achaete-scute homologue-1</i>
HAT	Histonacetyltransferase
HAUSP	Herpesvirus assoziierte Ubiquitin spezifische Protease
HBS	HEPES-gepufferte Salzlösung
HCF-1	<i>human host cell factor-1</i>
HDAC	Histondeacetylase
Hdm2	<i>human double minute 2</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperaziny)-ethansulfonsäure, eine Puffersubstanz
HIC-1	hypermethyliert in Krebs 1
HIPK2	Homeodomän interagierende Proteinkinase 2
His	Histidin
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> (Meerrettich-Peroxidase)
HSP90	<i>heat-shock protein 90</i>
IAP	<i>inhibitor of apoptosis</i>
IF	Immunofluoreszenz
inkl	inklusive
INSS	<i>international neuroblastoma staging system</i>
IP	Immunopräzipitation
i.R.	in der Regel
JMY	<i>junction-mediating and regulatory protein</i>
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
k	Kilo
kb	Kilobasenpaare

kDa	Kilodalton
KIP	<i>kinase inhibitory protein</i>
KL1	Kaiso Like 1
KV	Kristallviolett
L	Liter
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium (Wachstumsmedium für E. coli)
LZ	Leuzin Zipper
M	molar
MAPK	mitogen-aktivierte Proteinkinase
Min	Minute(n)
Miz1	Myc-interagierendes-Zinkfinger-Protein 1
ml	Milliliter
mM	milimolar
M-MLV RT	<i>moloney murine leukemia virus reverse transkriptase</i>
MMP7	Matrix-Metalloproteinase 7
MoMuLV	<i>moloney murine leukemia virus</i>
mSin3	<i>mammalian Sin3</i>
Myc	<i>Myelocytomatoose Proteinv-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
μ	mikro
NCoR	<i>nuclear receptor co-repressor 2</i>
NES	<i>nuclear export signal</i>
NGS	<i>normal goat serum</i>
NLK	<i>nemo-like kinase</i>
NLS	<i>nuclear localisation signal</i>
nm	Nanometer
NP-40	Nonidet P-40
N-Terminus	Amino-Terminus
OD	Optische Dichte
o.g.	oben genannt
ONPG	o-Nitrophenyl-β-D-galaktopyranosid

p300 (EP300)	<i>E1A binding protein p300</i>
p53AIP1	p53 reguliertes Apoptose induzierendes Protein 1
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (Phosphatgepufferte Salzlösung)
PCNA	<i>proliferating cell nuclear antigen</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PDP	Pyruvat-Dehydrogenase-Phosphatase
pH	pH-Wert
Phox2a/b	<i>paired-like homeobox 2a/b</i>
PI	Propidiumiodid
PI-Cocktail	Proteaseinhibitor-Cocktail
PLZF	promyelozytischer leukämischer Zinkfinger
POZ	Poxvirus und Zinkfinger-Domäne
puro	Puromycin
PVDF	Polyvinylidendifluorid
qRT-PCR	quantitative RT-PCR
RAR	<i>retinoic acid receptor</i>
RbAp46 (RBBP7)	<i>(retinoblastoma binding protein 7)</i>
RE	Restriktionsenzym
RhoA	<i>ras homolog gene family, member A</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RPMI	Zellkulturmedium, benannt nach Entwicklungsort, dem Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
RT-	Reverse Transkription
s.	siehe
SAHA	<i>suberoylanilide hydroxamic acid</i>
SAP (SH2D1A)	<i>(SH2 domain protein 1A)</i>

SDS	<i>sodiumdodecylsulfate</i> (Natriumdodezylphosphat)
SDS3 (SUDS3)	<i>suppressor of defective silencing 3 homolog</i>
sec	Sekunde
Ser	Serin
shRNA	short-hairpin-RNA
SMRT	<i>silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptor</i>
Sp	<i>stimulating protein</i>
s.u.	siehe unten
Ta	Annealing-Temperatur
TAD	Transaktivierungsdomäne
TAE	Tris-Azetat/EDTA-Puffer
target	Ziel
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBS	<i>tris buffered saline</i> (Tris gepufferte Salzlösung)
TBS-T	Tris gepufferte Salzlösung mit Tween-20
TE	Tris/EDTA (Puffer)
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TERT	Telomerase Reverse Transkriptase
TGFβ	<i>transforming growth factor, beta</i>
Thr	Threonin
TopBP1	<i>topoisomerase II binding protein</i>
TP53	Tumorprotein p53
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
TRK	NTRK1 (neurotrophischer Tyrosinkinase-Rezeptor Typ1)
TSA	Trichostatin A
Twist	Twist homolog 1
u	<i>unit</i>
UTR	untranslatierte Region
UV	ultraviolett
UVB	Ultraviolett-B-Strahlung
ü.N.	über Nacht
VT	Volumenteil

W	Woche
WB	Western-Blot
Wnt5B	<i>wingless-type MMTV integration site family, member 5B</i>
WT	Wildtyp
w/v	<i>weight per volume</i>
z.B.	zum Beispiel
ZBTB	Zinkfinger-Protein mit BTB/POZ-Domäne
ZF	Zinkfinger
-/-	homozygote Gendeletion

10. LITERATURVERZEICHNIS

Abraham RT (2001). Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. *Genes Dev.* 15, 2177-2196.

Adhikary S, Peukert K, Karsunky H, Beuger V, Lutz W, Elsässer HP, Möröy T, Eilers M (2003). Miz1 is required for early embryonic development during gastrulation. *Mol Cell Biol.* 23, 7648-7657.

Albagli O, Dhordain P, Deweindt C, Lecocq G, Leprince D (1995). The BTB/POZ domain: a new protein-protein interaction motif common to DNA- and actin-binding proteins. *Cell Growth Differ.* 6, 1193-1198.

Albrecht JH, Poon RY, Ahonen CL, Rieland BM, Deng C, Crary GS (1998). Involvement of p21 and p27 in the regulation of CDK activity and cell cycle progression in the regenerating liver. *Oncogene* 16, 2141-2150.

Alland L, David G, Shen-Li H, Potes J, Muhle R, Lee HC, Hou H Jr, Chen K, De-Pinho RA (2002). Identification of mammalian Sds3 as an integral component of the Sin3/histone deacetylase corepressor complex. *Mol Cell Biol.* 22, 2743-2750.

Allen brain atlas. www.brain-map.org

Anderson DJ, Axel R (1986). A bipotential neuroendocrine precursor whose choice of cell fate is determined by NGF and glucocorticoids. *Cell* 47, 1079-1090.

Anderson DJ, Carnahan JF, Michelsohn A, Patterson PH (1991). Antibody markers identify a common progenitor to sympathetic neurons and chromaffin cells in vivo and reveal the timing of commitment to neuronal differentiation in the sympathoadrenal lineage. *J Neurosci.* 11, 3507-3519.

Asada M, Yamada T, Ichijo H, Delia D, Miyazono K, Fukumuro K, Mizutani S (1999). Apoptosis inhibitory activity of cytoplasmic p21(Cip1/WAF1) in monocytic differentiation. *EMBO J.* 18, 1223-1234.

Bagchi A, Papazoglu C, Wu Y, Capurso D, Brodt M, Francis D, Bredel M, Vogel H, Mills AA (2007). CHD5 is a tumor suppressor at human 1p36. *Cell* 128, 459-475.

Bardwell VJ, Treisman R (1994). The POZ domain: a conserved protein-protein interaction motif. *Genes Dev.* 8, 1664-1677.

Berthet C, Aleem E, Coppola V, Tessarollo L, Kaldis P (2003). Cdk2 knockout mice are viable. *Curr Biol.* 13, 1775-1785.

Berwanger B, Hartmann O, Bergmann E, Bernard S, Nielsen D, Krause M, Kartal A, Flynn D, Wiedemeyer R, Schwab M, Schäfer H, Christiansen H, Eilers M (2002). Loss of a FYN-regulated differentiation and growth arrest pathway in advanced stage neuroblastoma. *Cancer Cell* 2, 377-386.

Bode AM, Dong Z (2004). Post-translational modification of p53 in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer* 4, 793-805.

Bolande RP (1974). Congenital and infantile neoplasia of the kidney. *Lancet* 2, 1497-1499.

Bourdeaut F, Trochet D, Janoueix-Lerosey I, Ribeiro A, Deville A, Coz C, Michiels JF, Lyonnet S, Amiel J, Delattre O (2005). Germline mutations of the paired-like homeobox 2B (PHOX2B) gene in neuroblastoma. *Cancer Lett.* 228, 51-58.

Boyd SD, Tsai KY, Jacks T (2000). An intact HDM2 RING-finger domain is required for nuclear exclusion of p53. *Nat Cell Biol.* 2, 563-568.

Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72, 248-254.

Brodeur GM, Pritchard J, Berthold F, Carlsen NL, Castel V, Castelberry RP, De Bernardi B, Evans AE, Favrot M, Hedborg F et al. (1993). Revisions of the international criteria for neuroblastoma diagnosis, staging, and response to treatment. *J Clin Oncol.* 11, 1466-1477.

Brodeur GM, Nakagawara A, Yamashiro DJ, Ikegaki N, Liu XG, Azar CG, Lee CP, Evans AE (1997). Expression of TrkA, TrkB and TrkC in human neuroblastomas. *J Neurooncol.* 31, 49-55.

Brodeur GM (2003). Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma. *Nat Rev Cancer.* 3, 203-216.

Brugarolas J, Moberg K, Boyd SD, Taya Y, Jacks T, Lees JA (1999). Inhibition of cyclin-dependent kinase 2 by p21 is necessary for retinoblastoma protein-mediated G1 arrest after gamma-irradiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 1002-1007.

Bunz F, Dutriaux A, Lengauer C, Waldman T, Zhou S, Brown JP, Sedivy JM, Kinzler KW, Vogelstein B (1998). Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage. *Science* 282, 1497-1501.

Carr J, Bell E, Pearson AD, Kees UR, Beris H, Lunec J, Tweddle DA (2006). Increased frequency of aberrations in the p53/MDM2/p14(ARF) pathway in neuroblastoma cell lines established at relapse. *Cancer Res.* 66, 2138-2145.

- Chen J, Jackson PK, Kirschner MW, Dutta A (1995). Separate domains of p21 involved in the inhibition of Cdk kinase and PCNA. *Nature* 374, 386-388.
- Cheng M, Olivier P, Diehl JA, Fero M, Roussel MF, Roberts JM, Sherr CJ (1999). The p21(Cip1) and p27(Kip1) CDK 'inhibitors' are essential activators of cyclin D-dependent kinases in murine fibroblasts. *EMBO J.* 18, 1571-1583.
- Cheng T, Rodrigues N, Shen H, Yang Y, Dombkowski D, Sykes M, Scadden DT (2000). Hematopoietic stem cell quiescence maintained by p21cip1/waf1. *Science* 287, 1804-1808.
- Chipuk JE, Kuwana T, Bouchier-Hayes L, Droin NM, Newmeyer DD, Schuler M, Green DR (2004). Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *Science* 303, 1010-1014.
- Collins NL, Reginato MJ, Paulus JK, Sgroi DC, Labaer J, Brugge JS (2005). G1/S cell cycle arrest provides anoikis resistance through Erk-mediated Bim suppression. *Mol Cell Biol.* 25, 5282-5291.
- Cowling VH, D'Cruz CM, Chodosh LA, Cole MD (2007). c-Myc transforms human mammary epithelial cells through repression of the Wnt inhibitors DKK1 and SFRP1. *MCB* 27, 5135-5146.
- Daniel JM, Spring CM, Crawford HC, Reynolds AB, Baig A (2002). The p120(ctn)-binding partner Kaiso is a bi-modal DNA-binding protein that recognizes both a sequence-specific consensus and methylated CpG dinucleotides. *Nucleic Acids Res* 30, 2911-2919.
- Dauphinot L, De Oliveira C, Melot T, Sevenet N, Thomas V, Weissman BE, Delattre O (2001). Analysis of the expression of cell cycle regulators in Ewing cell lines: EWS-FLI-1 modulates p57KIP2 and c-Myc expression. *Oncogene* 20, 3258-3265.
- David G, Alland L, Hong SH, Wong CW, DePinho RA, Dejean A (1998). Histone deacetylase associated with mSin3A mediates repression by the acute promyelocytic leukemia-associated PLZF protein. *Oncogene* 16, 2549-2556.
- Dhordain P, Lin RJ, Quief S, Lantoine D, Kerckaert JP, Evans RM, Albagli O (1998). The LAZ3(BCL-6) oncoprotein recruits a SMRT/mSIN3A/histone deacetylase containing complex to mediate transcriptional repression. *Nucleic Acids Res.* 26, 4645-4651.
- Di Stefano V, Rinaldo C, Sacchi A, Soddu S, D'Orazi G (2004). Homeodomain-interacting protein kinase-2 activity and p53 phosphorylation are critical events for cis-platin-mediated apoptosis. *Exp Cell Res.* 293, 311-320.

- D'Orazi G, Cecchinelli B, Bruno T, Manni I, Higashimoto Y, Saito S, Gostissa M, Coen S, Marchetti A, Del Sal G, Piaggio G, Fanciulli M, Appella E, Soddu S (2002). Homeodomain-interacting protein kinase-2 phosphorylates p53 at Ser 46 and mediates apoptosis. *Nat Cell Biol.* 4, 11-19.
- Dronkert ML, Kanaar R (2001). Repair of DNA interstrand cross-links. *Mutat Res.* 486, 217-247.
- El-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, Lin D, Mercer WE, Kinzler KW, Vogelstein B (1993). WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 75, 817-825.
- El-Deiry WS, Harper JW, O'Connor PM, Velculescu VE, Canman CE, Jackman J, Pietsenpol JA, Burrell M, Hill DE, Wang Y (1994). WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. *Cancer Res.* 54, 1169-1174.
- Evan GI, Vousden KH (2001). Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature* 411, 342-348.
- Filion GJP, Zhenilo S, Salozhin S, Yamada D, Prokhortchouk E, Defossez PA (2006). A Family of Human Zinc Finger Proteins That Bind Methylated DNA and Repress Transcription. *Mol Cell Biol* 26; 169-181.
- Furchert SE, Lanvers-Kaminsky C, Jürgens H, Jung M, Loidl A, Frühwald MC (2007). Inhibitors of histone deacetylases as potential therapeutic tools for high-risk embryonal tumors of the nervous system of childhood. *Int J Cancer* 120, 1787-1794.
- Gartel AL, Tyner AL (1999). Transcriptional regulation of the p21((WAF1/CIP1)) gene. *Exp Cell Res.* 246, 280-289.
- Gartel AL, Shchors K (2003). Mechanisms of c-myc-mediated transcriptional repression of growth arrest genes. *Exp Cell Res.* 283, 17-21.
- Gartel AL, Radhakrishnan SK (2005). Lost in transcription: p21 repression, mechanisms, and consequences. *Cancer Res.* 65, 3980-3985.
- Gebhardt A, Frye M, Herold S, Benitah SA, Braun K, Samans B, Watt FM, Elsässer HP, Eilers M (2006). Myc regulates keratinocyte adhesion and differentiation via complex formation with Miz1. *J Cell Biol.* 172, 139-149.
- Geiger TR and Peeper DS (2005). The neurotrophic receptor TrkB in anoikis resistance and metastasis: a perspective. *Cancer Res* 65, 7033-7036.
- Geyer RK, Yu ZK, Maki CG (2000). The MDM2 RING-finger domain is required to promote p53 nuclear export. *Nat Cell Biol.* 2, 569-573.

Giannakakou P, Sackett DL, Ward Y, Webster KR, Blagosklonny MV, Fojo T, (2000). p53 is associated with cellular microtubules and is transported to the nucleus by dynein. *Nat Cell Biol.* 2, 709-717.

Giannakakou P, Nakano M, Nicolaou KC, O'Brate A, Yu J, Blagosklonny MV, Greber UF, Fojo T (2002) Enhanced microtubule-dependent trafficking and p53 nuclear accumulation by suppression of microtubule dynamics. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 10855-10860.

Goto H, Motomura S, Wilson AC, Freiman RN, Nakabeppu Y, Fukushima K, Fujishima M, Herr W, Nishimoto T (1997). A single-point mutation in HCF causes temperature-sensitive cell-cycle arrest and disrupts VP16 function. *Genes Dev.* 11, 726-737.

Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol.* 36, 59-74.

Grignani F, Kinsella T, Mencarelli A, Valtieri M, Riganelli D, Lanfranccone L, Peschle C, Nolan GP, Pelicci PG (1998). High-efficiency gene transfer and selection of human hematopoietic progenitor cells with a hybrid EBV/retroviral vector expressing the green fluorescence protein. *Cancer Res* 58, 14-19.

Gu W, Roeder RG (1997). Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain. *Cell* 90, 595-606.

Gui H, Li S, Matise MP (2007). A cell-autonomous requirement for Cip/Kip cyclin-kinase inhibitors in regulating neuronal cell cycle exit but not differentiation in the developing spinal cord. *Dev Biol.* 301, 14-26.

Guillemot F, Lo LC, Johnson JE, Auerbach A, Anderson DJ, Joyner AL (1993). Mammalian achaete-scute homolog 1 is required for the early development of olfactory and autonomic neurons. *Cell* 75, 463-476.

Harper JW, Adami GR, Wei N, Keyomarsi K, Elledge SJ (1993). The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* 75, 805-816.

Herold S, Wanzel M, Beuger V, Frohme C, Beul D, Hillukkala T, Syvaioja J, Saluz HP, Hänel F, Eilers M (2002). Negative Regulation of the Mammalian UV Response by Myc through Association with Miz-1. *Mol. Cell.* 10, 509-521.

Hirao A, Kong YY, Matsuoka S, Wakeham A, Ruland J, Yoshida H, Liu D, Elledge SJ, Mak TW (2000). DNA damage-induced activation of p53 by the checkpoint kinase Chk2. *Science* 287, 1824-1827.

Hiyama E, Hiyama K, Yokoyama T, Matsuura Y, Piatyszek MA, Shay JW (1995).

Correlating telomerase activity levels with human neuroblastoma outcomes. *Nat Med.* *1*, 249-255.

Huang S, Shu L, Dilling MB, Easton J, Harwood FC, Ichijo H, Houghton PJ (2003). Sustained activation of the JNK cascade and rapamycin-induced apoptosis are suppressed by p53/p21(Cip1). *Mol Cell.* *11*, 1491-1501.

Hubbert C, Guardiola A, Shao R, Kawaguchi Y, Ito A, Nixon A, Yoshida M, Wang XF, Yao TP (2002). HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase. *Nature* *417*, 455-458.

Huber K (2006). The sympathoadrenal cell lineage: specification, diversification, and new perspectives. *Dev Biol.* *298*, 335-343.

Huibregtse JM, Scheffner M, Howley PM (1993). Localization of the E6-AP regions that direct human papillomavirus E6 binding, association with p53, and ubiquitination of associated proteins. *Mol Cell Biol.* *13*, 4918-4927.

Islam A, Kageyama H, Takada N, Kawamoto T, Takayasu H, Isogai E, Ohira M, Hashizume K, Kobayashi H, Kaneko Y, Nakagawara A (2000). High expression of Survivin, mapped to 17q25, is significantly associated with poor prognostic factors and promotes cell survival in human neuroblastoma. *Oncogene* *19*; 617-623.

Joerger AC, Fersht AR (2007). Structure-function-rescue: the diverse nature of common p53 cancer mutants. *Oncogene* *26*, 2226-2242.

Jordan A, Hadfield JA, Lawrence NJ, McGown AT (1998). Tubulin as a target for anticancer drugs: agents which interact with the mitotic spindle. *Med Res Rev.* *18*, 259-296.

Juan LJ, Shia WJ, Chen MH, Yang WM, Seto E, Lin YS, Wu CW (2000). Histone deacetylases specifically down-regulate p53-dependent gene activation. *J Biol Chem.* *275*, 20436-20443.

Kaghad M, Bonnet H, Yang A, Creancier L, Biscan JC, Valent A, Minty A, Chalon P, Lelias JM, Dumont X, Ferrara P, McKeon F, Caput D (1997). Monoallelically expressed gene related to p53 at 1p36, a region frequently deleted in neuroblastoma and other human cancers. *Cell* *22*, 809-819.

Kamijo T, Weber JD, Zambetti G, Zindy F, Roussel MF, Sherr CJ (1998). Functional and physical interactions of the ARF tumor suppressor with p53 and Mdm2. *Proc Natl Acad Sci U S A* *95*, 8292-8297.

Katoh M (2005). WNT/PCP signaling pathway and human cancer (review). *Oncol Rep* *14*, 1583-1588.

Kawaguchi Y, Kovacs JJ, McLaurin A, Vance JM, Ito A, Yao TP (2003). The deacetylase HDAC6 regulates aggresome formation and cell viability in response to misfolded protein stress. *Cell* 115, 727-738.

Kelly KF, Daniel JM (2006). POZ for effect-POZ-ZF transcription factors in cancer and development. *Trends Cell Biol.* 16, 578-587.

Khanna KK, Keating KE, Kozlov S, Scott S, Gatei M, Hobson K, Taya Y, Gabrielli B, Chan D, Lees-Miller SP, Lavin MF (1998). ATM associates with and phosphorylates p53: mapping the region of interaction. *Nat Genet.* 20, 398-400.

Kippin TE, Martens DJ, van der Kooy D (2005). p21 loss compromises the relative quiescence of forebrain stem cell proliferation leading to exhaustion of their proliferation capacity. *Genes Dev.* 19, 756-767.

Knoepfler PS, Eisenman RN (1999). Sin meets NuRD and other tails of repression. *Cell.* 99, 447-450.

Kolligs FT, Bommer G, Göke B (2002). Wnt/beta-catenin/tcf signaling: a critical pathway in gastrointestinal tumorigenesis. *Digestion* 66,131-144.

Korinek V, Barker N, Morin PJ, van Wichen D, de Weger R, Kinzler KW, Vogelstein B, Clevers H (1997). Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC^{-/-} colon carcinoma. *Science* 275, 1784-1787.

Korinek V, Barker N, Moerer P, van Donselaar E, Huls G, Peters PJ, Clevers H (1998). Depletion of epithelial stem-cell compartments in the small intestine of mice lacking Tcf-4. *Nat Genet.* 19, 379-383.

Kovacs JJ, Murphy PJ, Gaillard S, Zhao X, Wu JT, Nicchitta CV, Yoshida M, Toft DO, Pratt WB, Yao TP (2005). HDAC6 regulates Hsp90 acetylation and chaperone-dependent activation of glucocorticoid receptor. *Mol Cell* 18, 601-607.

Kuhnert F, Davis CR, Wang HT, Chu P, Lee M, Yuan J, Nusse R, Kuo CJ (2004). Essential requirement for Wnt signaling in proliferation of adult small intestine and colon revealed by adenoviral expression of Dickkopf-1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101, 266-271.

LaBaer J, Garrett MD, Stevenson LF, Slingerland JM, Sandhu C, Chou HS, Fattaey A, Harlow E (1997). New functional activities for the p21 family of CDK inhibitors. *Genes Dev.* 11, 847-862.

LaBonne C, Bronner-Fraser M (1999). Molecular mechanisms of neural crest formation. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 15, 81-112.

Laemmli UK, Beguin F, Gujer-Kellenberger G (1970). A factor preventing the major head protein of bacteriophage T4 from random aggregation. *J Mol Biol* 47, 69-85.

Lagger G, Doetzelhofer A, Schuettengruber B, Haidweger E, Simboeck E, Tischler J, Chiocca S, Suske G, Rotheneder H, Wintersberger E, Seiser C (2003). The tumor suppressor p53 and histone deacetylase 1 are antagonistic regulators of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21/WAF1/CIP1 gene. *Mol Cell Biol.* 23, 2669-2679.

Lagger G, O'Carroll D, Rembold M, Khier H, Tischler J, Weitzer G, Schuettengruber B, Hauser C, Brunmeier R, Jenuwein T, Seiser C (2002). Essential function of histone deacetylase 1 in proliferation control and CDK inhibitor repression. *EMBO J.* 21, 2672-2681.

Laine H, Doetzelhofer A, Mantela J, Ylikoski J, Laiho M, Roussel MF, Segil N, Pirvola U (2007). p19(Ink4d) and p21(Cip1) collaborate to maintain the postmitotic state of auditory hair cells, their codeletion leading to DNA damage and p53-mediated apoptosis. *J Neurosci.* 27, 1434-1444.

Langley K, Grant NJ (1999). Molecular markers of sympathoadrenal cells. *Cell Tissue Res.* 298, 185-206.

Lapointe J, Li C, Higgins JP, van der Rijn M, Bair E, Montgomery K, Ferrari M, Egevad L, Rayford W, Bergerheim U, Ekman P, DeMarzo AM, Tibshirani R, Botstein D, Brown PO, Brooks JD, Pollack JR (2004). Gene expression profiling identifies clinically relevant subtypes of prostate cancer. *PNAS* 101, 811-816.

Leu JI, Dumont P, Hafey M, Murphy ME, George DL (2004). Mitochondrial p53 activates Bak and causes disruption of a Bak-Mcl1 complex. *Nat Cell Biol.* 6, 443-450.

Levine AJ (1997). p53, the cellular gatekeeper for growth and Division. *Cell* 88, 323-331.

Levkau B, Koyama H, Raines EW, Clurman BE, Herren B, Orth K, Roberts JM, Ross R (1998). Cleavage of p21Cip1/Waf1 and p27Kip1 mediates apoptosis in endothelial cells through activation of Cdk2: role of a caspase cascade. *Mol Cell* 1, 553-563.

Li M, Chen D, Shiloh A, Luo J, Nikolaev AY, Qin J, Gu W (2002). Deubiquitination of p53 by HAUSP is an important pathway for p53 stabilization. *Nature* 416, 648-653.

Linzer DI, Levine AJ (1979). Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell* 17, 43-52.

Longo L, Tonini GP, Ceccherini I, Perri P (2005). Oligogenic inheritance in neuroblastoma. *Cancer Lett.* 228, 65-69.

- Longo L, Panza E, Schena F, Seri M, Devoto M, Romeo G, Bini C, Pappalardo G, Tonini GP, Perri P (2007). Genetic predisposition to familial neuroblastoma: identification of two novel genomic regions at 2p and 12p. *Hum Hered.* 63, 205-211.
- Lowe SW, Sherr CJ (2003). Tumor suppression by Ink4a-Arf: progress and puzzles. *Curr Opin Genet Dev.* 13, 77-83.
- Luedde T, Rodriguez ME, Tacke F, Xiong Y, Brenner DA, Trautwein C (2003). p18(INK4c) collaborates with other CDK-inhibitory proteins in the regenerating liver. *Hepatology* 37, 833-841.
- Macleod KF, Sherry N, Hannon G, Beach D, Tokino T, Kinzler K, Vogelstein B, Jacks T (1995). p53-dependent and independent expression of p21 during cell growth, differentiation, and DNA damage. *Genes Dev.* 9, 935-944.
- Marchenko ND, Zaika A, Moll UM (2000). Death Signal-induced Localization of p53 Protein to Mitochondria. *JBC* 275, 16202-16212.
- Maris JM (2005). The biologic basis for neuroblastoma heterogeneity and risk stratification. *Curr Opin Pediatr.* 17, 7-13.
- Martins CP, Brown-Swigart L, Evan GI (2006). Modeling the therapeutic efficacy of p53 restoration in tumors. *Cell* 127, 1323-1334.
- Mäkinen M, Hillukkala T, Tuusa J, Reini K, Vaara M, Huang D, Pospiech H, Majuri I, Westerling T, Mäkelä TP, Syväoja JE (2001). BRCT domain-containing protein TopBP1 functions in DNA replication and damage response. *J Biol Chem.* 276, 30399-30406.
- McHugh PJ, Spanswick VJ, Hartley JA (2001). Repair of DNA interstrand crosslinks: molecular mechanisms and clinical relevance. *Lancet Oncol* 2, 483-490.
- Melnick A, Carlile G, Ahmad KF, Kiang CL, Corcoran C, Bardwell V, Prive GG, Licht JD (2002). Critical residues within the BTB domain of PLZF and Bcl-6 modulate interaction with corepressors. *Mol Cell Biol.* 22, 1804-1818.
- Mihara M, Erster S, Zaika A, Petrenko O, Chittenden T, Pancoska P, Moll UM (2003). p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. *Mol Cell* 11, 577-590.
- Minucci S, Pelicci PG (2006). Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer. *Nat Rev Cancer*, 1, 38-51.
- Morgenstern JP, Land H (1990). Advanced mammalian gene transfer: high titre retroviral vectors with multiple drug selection markers and a complementary helper-free packaging cell line. *Nucl Acids Res.* 18, 3587-3596.

Morin PJ, Sparks AB, Korinek V, Barker N, Clevers H, Vogelstein B, Kinzler KW (1997). Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. *Science* 275, 1787-1790.

Mühlethaler-Mottet A, Flahaut M, Bourlout KB, Auderset K, Meier R, Joseph JM, Gross N (2006). Histone deacetylase inhibitors strongly sensitise neuroblastoma cells to TRAIL-induced apoptosis by a caspases-dependent increase of the pro- to anti-apoptotic proteins ratio. *BMC Cancer* 6, 214.

Nakano K, Vousden KH (2001). PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol Cell* 7, 683–694.

National Cancer Institute, USA. www.cancer.gov

NB2004 Trial Protocol for Risk Adapted Treatment of Children with Neuroblastoma, Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie, Prof. Dr. Frank Berthold, Köln, Version 1, 1. September 2004.

Niculescu AB 3rd, Chen X, Smeets M, Hengst L, Prives C, Reed SI (1998). Effects of p21(Cip1/Waf1) at both the G1/S and the G2/M cell cycle transitions: pRb is a critical determinant in blocking DNA replication and in preventing endoreduplication. *Mol Cell Biol.* 18, 629-643.

Noda A, Ning Y, Venable SF, Pereira-Smith OM, Smith JR (1994). Cloning of senescent cell-derived inhibitors of DNA synthesis using an expression screen. *Exp Cell Res.* 211, 90-98.

Ocker M, Schneider-Stock R (2007). Histone deacetylase inhibitors: signalling towards p21cip1/waf1. *Int J Biochem Cell Biol.* 39, 1367-1374.

Oda E, Ohki R, Murasawa H, Nemoto J, Shibue T, Yamashita T, Tokino T, Taniguchi T, Tanaka N (2000). Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science* 288, 1053–1058.

Oda K, Arakawa H, Tanaka T, Matsuda K, Tanikawa C, Mori T, Nishimori H, Tamai K, Tokino T, Nakamura Y, Taya Y (2000). p53AIP1, a potential mediator of p53-dependent apoptosis, and its regulation by Ser-46-phosphorylated p53. *Cell* 102, 849-862.

Oikawa Y, Matsuda E, Nishii T, Ishida Y, Kawaichi M (2008). Down-regulation of CIBZ, a novel substrate of caspase-3, induces apoptosis. *J Biol Chem.* 283, 14242-14247.

Olashaw N, Bagui TK, Pledger WJ (2004). Cell cycle control: a complex issue. *Cell Cycle* 3, 263-264.

Oncomine-Datenbank. www.oncomine.org

Oren M (2003). Decision making by p53: life, death and cancer. *Cell Death Differ* 10: 431-442.

Ortega S, Prieto I, Odajima J, Martín A, Dubus P, Sotillo R, Barbero JL, Malumbres M, Barbacid M (2003). Cyclin-dependent kinase 2 is essential for meiosis but not for mitotic cell division in mice. *Nat Genet.* 35, 25-31.

Parker SB, Eichele G, Zhang P, Rawls A, Sands AT, Bradley A, Olson EN, Harper JW, Elledge SJ (1995). p53-independent expression of p21Cip1 in muscle and other terminally differentiating cells. *Science* 267, 1024-1027.

Parry D, Mahony D, Wills K, Lees E (1999). Cyclin D-CDK subunit arrangement is dependent on the availability of competing INK4 and p21 class inhibitors. *Mol Cell Biol.* 19, 1775-1783.

Pattyn A, Morin X, Cremer H, Goridis C, Brunet JF (1999). The homeobox gene *Phox2b* is essential for the development of autonomic neural crest derivatives. *Nature* 399, 366-370.

Peukert K, Staller P, Schneider A, Carmichael G, Hänel F, Eilers M (1997). An alternative pathway for gene regulation by Myc. *EMBO J.* 16, 5672-5686.

Phan RT, Saito M, Basso K, Niu H, Dalla-Favera R (2005). BCL6 interacts with the transcription factor Miz-1 to suppress the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 and cell cycle arrest in germinal center B cells. *Nat Immunol.* 6, 1054-1060.

Piluso D, Bilan P, Capone JP (2002). Host cell factor-1 interacts with and antagonizes transactivation by the cell cycle regulatory factor Miz-1. *J Biol Chem.* 277, 46799-46808.

Pinto D, Gregorieff A, Begthel H, Clevers H (2003). Canonical Wnt signals are essential for homeostasis of the intestinal epithelium. *Genes Dev.* 17, 1709-1713.

Polakis P (1999). The oncogenic activation of beta-catenin. *Curr Opin Genet Dev.* 9, 15-21.

Pomerantz J, Schreiber-Agus N, Liégeois NJ, Silverman A, Alland L, Chin L, Potes J, Chen K, Orlow I, Lee HW, Cordon-Cardo C, DePinho RA (1998). The Ink4a tumor suppressor gene product, p19Arf, interacts with MDM2 and neutralizes MDM2's inhibition of p53. *Cell* 92, 713-723.

Puisieux A, Valsesia-Wittmann S, Ansieau S (2006). A twist for survival and cancer progression. *Br J Cancer.* 94, 13-17.

Ramaswamy S, Ross KN, Lander ES and Golub TR (2003). A molecular signature of

metastasis in primary solid tumors. *Nat Genet* 33, 49-54.

Reissmann E, Ernsberger U, Francis-West PH, Rueger D, Brickell PM, Rohrer H (1996). Involvement of bone morphogenetic protein-4 and bone morphogenetic protein-7 in the differentiation of the adrenergic phenotype in developing sympathetic neurons. *Development* 122, 2079-2088.

Rennebeck G, Martelli M and Kyprianou N (2005). Anoikis and survival connections in the tumor microenvironment: is there a role in prostate cancer metastasis? *Cancer Res* 65, 11230-11235.

Rhodes DR, Yu J, Shanker K, Deshpande N, Varambally R, Ghosh D, Barrette T, Pandey A, Chinnaiyan, AM (2004). ONCOMINE: a cancer microarray database and integrated data-mining platform. *Neoplasia* 6, 1-6.

Roth J, Dobbelsstein M, Freedman DA, Shenk T, Levine AJ (1998). Nucleocytoplasmic shuttling of the hdm2 oncoprotein regulates the levels of the p53 protein via a pathway used by the human immunodeficiency virus rev protein. *EMBO J.* 17, 554-564.

Saitoh T, Katoh M (2001). Molecular cloning and characterization of human WNT5B on chromosome 12p13.3 region. *Int J Oncol.* 19, 347-351.

Samuels-Lev Y, O'Connor DJ, Bergamaschi D, Trigiante G, Hsieh JK, Zhong S, Campargue I, Naumovski L, Crook T, Lu X (2001). ASPP proteins specifically stimulate the apoptotic function of p53. *Mol Cell* 8, 781-794.

Sansom OJ, Meniel VS, Muncan V, Phesse TJ, Wilkins JA, Reed KR, Vass JK, Athineos D, Clevers H, Clarke AR (2007). Myc deletion rescues Apc deficiency in the small intestine. *Nature* 446, 676-679.

Sarnow P, Ho YS, Williams J, Levine AJ (1982). Adenovirus E1b-58 kd tumor antigen and SV40 large tumor antigen are physically associated with the same 54 kd cellular protein in transformed cells. *Cell* 28, 387-394.

Schmitt CA, Fridman JS, Yang M, Baranov E, Hoffman RM, Lowe SW (2002). Dissecting p53 tumor suppressor functions in vivo. *Cancer Cell* 1, 289-298.

Schmitt E, Paquet C, Beauchemin M, Bertrand R (2007). DNA-damage response network at the crossroads of cell-cycle checkpoints, cellular senescence and apoptosis. *J Zhejiang Univ Sci B.* 8, 377-397.

Schneider C, Wicht H, Enderich J, Wegner M, Rohrer H (1999). Bone morphogenetic proteins are required in vivo for the generation of sympathetic neurons. *Neuron* 24, 861-870.

Schuler M, Bossy-Wetzel E, Goldstein JC, Fitzgerald P, Green DR (2000). p53 induces apoptosis by caspase activation through mitochondrial cytochrome c release. *J Biol Chem.* 275, 7337-7342.

Seigneurin-Berny D, Verdel A, Curtet S, Lemerrier C, Garin J, Rousseaux S, Khochbin S (2001). Identification of components of the murine histone deacetylase 6 complex: link between acetylation and ubiquitination signaling pathways. *Mol Cell Biol.* 21, 8035-8044.

Seoane J, Pouponnot C, Staller P, Schader M, Eilers M, Massagué J (2001). TGFbeta influences Myc, Miz-1 and Smad to control the CDK inhibitor p15INK4b. *Nat Cell Biol.* 3, 400-408.

Seoane J, Le HV, Massagué J (2002). Myc suppression of the p21(Cip1) Cdk inhibitor influences the outcome of the p53 response to DNA damage. *Nature*, 419, 729-734.

Shah NM, Groves AK, Anderson DJ (1996). Alternative neural crest cell fates are instructively promoted by TGFbeta superfamily members. *Cell* 85, 331-343.

Sherr CJ, Roberts JM (1999). CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev.* 13, 1501-5012.

Sherr CJ, McCormick F (2002). The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer Cell* 2, 103-112.

Shikama N, Lee CW, France S, Delavaine L, Lyon J, Krstic-Demonacos M, La Thangue NB (1999). A novel cofactor for p300 that regulates the p53 response. *Mol Cell.* 4, 365-376

Silverstein RA, Ekwall K (2005). Sin3: a flexible regulator of global gene expression and genome stability. *Curr Genet.* 47, 1-17.

Sluss HK, Armata H, Gallant J, Jones SN (2004). Phosphorylation of serine 18 regulates distinct p53 functions in mice. *Mol Cell Biol.* 24, 976-984.

Speidel D, Bruederle CE, Enk C, Voets T, Varoqueaux F, Reim K, Becherer U, Fornai F, Ruggieri S, Holighaus Y, Weihe E, Bruns D, Brose N, Rettig J (2005). CAPS1 Regulates Catecholamine Loading of Large Dense-Core Vesicles. *Neuron* 46, 2-4.

Staller P, Peukert K, Kiermaier A, Seoane J, Lukas J, Karsunky H, Möröy T, Bartek J, Massagué J, Hänel F, Eilers M (2001). Repression of p15INK4b expression by Myc through association with Miz-1. *Nat Cell Biol.* 3, 392-399.

St Clair S, Giono L, Varmeh-Ziaie S, Resnick-Silverman L, Liu WJ, Padi A, Dastidar J, DaCosta A, Mattia M, Manfredi JJ (2004). DNA damage induced downregulation of

Cdc25C is mediated by p53 via two independent mechanisms: one involves direct binding to the cdc25C promoter. *Mol Cell*, 16, 725-736.

Stogios PJ, Downs GS, Jauhal JJ, Nandra SK, Privé GG (2005). Sequence and structural analysis of BTB domain proteins. *Genome Biol.* 6, R82.1-R82.18.

Stommel JM, Marchenko ND, Jimenez GS, Moll UM, Hope TJ, Wahl GM (1999). A leucine-rich nuclear export signal in the p53 tetramerization domain: regulation of subcellular localization and p53 activity by NES masking. *EMBO J.* 18, 1660-1672.

Sun A, Bagella L, Tutton S, Romano G, Giordano A (2007). From G0 to S phase: a view of the roles played by the retinoblastoma (Rb) family members in the Rb-E2F pathway. *J Cell Biochem* 102, 1400-1404.

Sun L, Hui AM, Su Q, Vortmeyer A, Kotliarov Y, Pastorino S, Passaniti A, Menon J, Walling J, Bailey R, Rosenblum M, Mikkelsen T, Fine HA (2006). Neuronal and glioma-derived stem cell factor induces angiogenesis within the brain. *Cancer Cell.* 9, 287-300.

Suzuki A, Tsutomi Y, Akahane K, Araki T, Miura M (1998). Resistance to Fas-mediated apoptosis: activation of caspase 3 is regulated by cell cycle regulator p21WAF1 and IAP gene family ILP. *Oncogene* 17, 931-939.

Tajiri T, Tanaka S, Higashi M, Kinoshita Y, Takahashi Y, Tatsuta K, Suita S (2006). Biological diagnosis for neuroblastoma using the combination of highly sensitive analysis of prognostic factors. *J Pediatr Surg.* 41, 560-566.

Tanaka T, Halicka HD, Traganos F, Seiter K, Darzynkiewicz Z (2007). Induction of ATM activation, histone H2AX phosphorylation and apoptosis by etoposide: relation to cell cycle phase. *Cell Cycle* 6, 371-376.

Tetsu O, McCormick F (2003). Proliferation of cancer cells despite CDK2 inhibition. *Cancer Cell* 3, 233-245.

Tomlins SA, Laxman B, Dhanasekaran SM, Helgeson BE, Cao X, Morris DS, Menon A, Jing X, Cao Q, Han B, Yu J, Wang L, Montie JE, Rubin MA, Pienta KJ, Roulston D, Shah RB, Varambally S, Mehra R, Chinnaiyan AM (2007). Distinct classes of chromosomal rearrangements create oncogenic ETS gene fusions in prostate cancer. *Nature* 448, 595-599.

Topley GI, Okuyama R, Gonzales JG, Conti C, Dotto GP (1999). p21(WAF1/Cip1) functions as a suppressor of malignant skin tumor formation and a determinant of keratinocyte stem-cell potential. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96, 9089-9094.

Trigiante G, Lu X (2006). ASPP and cancer. *Nat Rev Cancer* 6, 217-226.

van de Wetering M, Sancho E, Verweij C, de Lau W, Oving I, Hurlstone A, van der Horn K, Batlle E, Coudreuse D, Haramis AP, Tjon-Pon-Fong M, Moerer P, van den Born M, Soete G, Pals S, Eilers M, Medema R, Clevers H (2002). The beta-catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells. *Cell* 111, 241-250.

van Roy FM, McCrea PD (2005). A role for Kaiso-p120ctn complexes in cancer? *Nat Rev Cancer* 5, 956-964.

van 't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, He YD, Hart AAM, Mao M, Peterse HL, van der Kooy K, Marton MJ, Witteveen AT, Schreiber GJ, Kerkhoven RM, Roberts C, Linsley PS, Bernards R, Friend SH (2002). Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 415, 530-536.

Vassilev LT, Vu BT, Graves B, Carvajal D, Podlaski F, Filipovic Z, Kong N, Kammlott U, Lukacs C, Klein C, Fotouhi N, Liu EA (2004). In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. *Science* 303, 844-848.

Ventura A, Kirsch DG, McLaughlin ME, Tuveson DA, Grimm J, Lintault L, Newman J, Reczek EE, Weissleder R, Jacks T (2007). Restoration of p53 function leads to tumour regression in vivo. *Nature* 445, 661-665.

Verdin E, Dequiedt F, Kasler HG (2003). Class II histone deacetylases: versatile regulators. *Trends Genet.* 19, 286-293.

Vousden KH (2000). p53: death star. *Cell* 103, 691-694.

Vousden KH, Woude GF (2000). The ins and outs of p53. *Nat Cell Biol.* 2, E178-E180.

Vousden KH, Lu X (2002). Live or let die: the cell's response to p53. *Nat Rev Cancer* 2: 594-604.

Vousden KH (2006). Outcomes of p53 activation--spoilt for choice. *J Cell Sci.* 119, 5015-5020.

Vousden KH, Lane DP (2007). p53 in health and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8, 275-283.

Wade PA (2001). Transcriptional control at regulatory checkpoints by histone deacetylases: molecular connections between cancer and chromatin. *Hum Mol Genet.* 10, 693-698.

Wanzel M, Kleine-Kohlbrecher D, Herold S, Hock A, Berns K, Park J, Hemmings B, Eilers M (2005). Akt and 14-3-3eta regulate Miz1 to control cell-cycle arrest after DNA damage. *Nat Cell Biol.* 7, 30-41.

Weber A, Marquardt J, Elzi D, Forster N, Starke S, Glaum A, Yamada D, Defossez PA, Delrow J, Eisenman RN, Christiansen H, Eilers M (2008). Zbtb4 represses transcription of P21CIP1 and controls the cellular response to p53 activation. *EMBO J.* 27, 1563-1574.

Winters ZE, Hunt NC, Bradburn MJ, Royds JA, Turley H, Harris AL, Norbury CJ (2001). Subcellular localisation of cyclin B, Cdc2 and p21(WAF1/CIP1) in breast cancer. association with prognosis. *Eur J Cancer* 37, 2405-2412.

Winters ZE, Leek RD, Bradburn MJ, Norbury CJ, Harris AL (2003). Cytoplasmic p21WAF1/CIP1 expression is correlated with HER-2/ neu in breast cancer and is an independent predictor of prognosis. *Breast Cancer Res.* 5, R242-R249.

Wu H, Wade M, Krall L, Grisham J, Xiong Y, Van Dyke T (1996). Targeted in vivo expression of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 halts hepatocyte cell-cycle progression, postnatal liver development and regeneration. *Genes Dev.* 10, 245-260.

Wu S, Cetinkaya C, Munoz-Alonso MJ, von der Lehr N, Bahram F, Beuger V, Eilers M, Leon J, Larsson LG (2003). Myc represses differentiation-induced p21CIP1 expression via Miz-1-dependent interaction with the p21 core promoter. *Oncogene* 22, 351-360.

Xue W, Zender L, Miething C, Dickins RA, Hernando E, Krizhanovsky V, Cordon-Cardo C, Lowe SW (2007). Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas. *Nature* 445, 656-660.

Yamane K, Wu X, Chen J (2002). A DNA damage-regulated BRCT-containing protein, TopBP1, is required for cell survival. *Mol Cell Biol.* 22, 555-566.

Yang A, Kaghad M, Wang Y, Gillett E, Fleming MD, Dötsch V, Andrews NC, Caput D, McKeon F (1998). p63, a p53 homolog at 3q27-29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities. *Mol Cell.* 2, 305-316.

Yang IV, Chen E, Hasseman JP, Liang W, Frank BC, Wang S, Sharov V, Saeed AI, White J, Li J, Lee NH, Yeatman TJ, Quackenbush J (2002). Within the fold: assessing differential expression measures and reproducibility in microarray assays. *Genome Biol.* 3, 0062.1-0062.12.

Yoon HG, Chan DW, Reynolds AB, Qin J, Wong J (2003). N-CoR mediates DNA methylation-dependent repression through a methyl CpG binding protein Kaiso. *Mol Cell* 12, 723-734.

You A, Tong JK, Grozinger CM, Schreiber SL (2001). CoREST is an integral component of the CoREST- human histone deacetylase complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 1454-1458.

Yu J, Zhang L, Hwang PM, Kinzler KW, Vogelstein B (2001). PUMA induces the rapid apoptosis of colorectal cancer cells. *Mol Cell* 7: 673–682.

Zhang X, Yuan Z, Zhang Y, Yong S, Salas-Burgos A, Koomen J, Olashaw N, Parsons JT, Yang XJ, Dent SR, Yao TP, Lane WS, Seto E (2007). HDAC6 modulates cell motility by altering the acetylation level of cortactin. *Mol Cell* 27, 197-213.

Zhang Y, Xiong Y, Yarbrough WG (1998). ARF promotes MDM2 degradation and stabilizes p53: ARF-INK4a locus deletion impairs both the Rb and p53 tumor suppression pathways. *Cell* 92, 725-734.

Zhou BP, Liao Y, Xia W, Spohn B, Lee MH, Hung MC (2001). Cytoplasmic localization of p21Cip1/WAF1 by Akt-induced phosphorylation in HER-2/neu-overexpressing cells. *Nat Cell Biol.* 3, 245-252.

Zindy F, Eischen CM, Randle DH, Kamijo T, Cleveland JL, Sherr CJ, Roussel MF (1998). Myc signaling via the ARF tumor suppressor regulates p53-dependent apoptosis and immortalization. *Genes Dev.* 12, 2424-2433.

11. MICROARRAY-LISTEN

KL1 DMSO -
LV DMSO

Fold change	direction	Genbank ID	Symbol	Fold change	direction	Genbank ID	Symbol
15,91	up	H77855	TRIM58	7,64	down	AA032077	NDUFB6
10,90	up	AA114966	WNT5B	7,38	down	N58170	NAT8
8,70	up	R66925	0	4,74	down	AA453742	SLC1A3
7,19	up	H66070	0	4,29	down	H78613	LOC645513
7,19	up	W95041	HS3ST3B1	4,06	down	H12044	CYFIP2
6,54	up	R62612	FN1	4,04	down	R01070	AIG1
6,53	up	AA598601	0	3,84	down	W86860	NVL
6,23	up	W02083	LOC401320	3,80	down	N35290	CDKN1A
6,11	up	N24880	0	3,78	down	R70505	P2RY2
5,95	up	T98612	0	3,75	down	R44496	PLEKHA7
5,41	up	AA455497	CCDC80	3,64	down	N46843	AQP4
5,30	up	N59438	HS3ST3A1	3,43	down	AA425451	ITGAE
5,25	up	N25798	ANKRD28	3,39	down	AA044267	P2RX5
5,24	up	T89094	RGS4	3,28	down	R62781	PVRL3
5,22	up	H21869	COX10	3,14	down	AA431179	SLC35D2
5,16	up	AA043944	EVI1	3,07	down	R39464	0
5,05	up	T66815	HIST1H1C	2,94	down	H18855	PPEF1
5,04	up	T65790	FDPS	2,93	down	N26665	SUHW2
5,00	up	W46900	CXCL1	2,90	down	N63567	PDK3
4,72	up	H48533	BIRC3	2,84	down	N90806	C5orf23
4,49	up	H22563	PLCB4	2,84	down	N52406	0
4,35	up	N73309	SSR3	2,80	down	T50370	C20orf119
4,28	up	H96241	GABPA	2,80	down	N52646	UBAP2L
4,27	up	AA009484	CRCT1	2,77	down	AA019320	ADD2
4,25	up	R78559	SF3B5	2,75	down	R59697	CDK8
4,06	up	W73366	CBL	2,75	down	AA018676	PRKAG1
3,96	up	AA974707	EGFR	2,71	down	N90783	P2RY5
3,94	up	AA461108	EFNB2	2,71	down	H10047	0
3,93	up	R62612	FN1	2,70	down	AA608713	C1QDC1
3,83	up	AA676458	LOXL2	2,68	down	R42685	IMPA2
3,77	up	AA173573	ECHDC1	2,67	down	H70047	RGS13
3,69	up	H22944	NNT	2,64	down	AA469975	SLC25A29
3,67	up	R25398	0	2,58	down	R95732	TRDMT1
3,63	up	R93124	AKR1C2	2,58	down	N45100	ZEB2
3,60	up	AA497027	M-RIP	2,58	down	AA629542	WASF3
3,56	up	T72258	TOM1L2	2,57	down	T67128	0
3,54	up	AA430625	DPYD	2,57	down	AA434135	CIZ1
3,40	up	T89996	0	2,57	down	AA010352	0
3,27	up	T61899	0	2,55	down	H49443	SYNPO
3,24	up	N22262	DOCK5	2,53	down	AA400187	NPHP1
3,23	up	W94295	ADAMTS6	2,53	down	AA620580	PSMB3
3,14	up	R44417	BIRC2	2,52	down	T67558	AIG1
3,11	up	AA400464	SOX9	2,51	down	R69885	HCFC1
3,04	up	H47327	TACC1	2,49	down	AA157499	MAPK13
2,98	up	R52786	WDR16	2,46	down	AA598517	KRT8
2,89	up	N54425	AGPAT5	2,44	down	N32542	TRIM14
2,87	up	N36421	0	2,42	down	AA621342	BRP44
2,84	up	H79795	HP1BP3	2,41	down	AA459100	TPD52
2,83	up	AA425947	DKK3	2,41	down	T91067	LOC144233
2,82	up	AA136707	PLOD2	2,40	down	AA126675	MARCH9
2,81	up	T54320	TOR1A	2,40	down	W80632	0
2,81	up	AA457140	DHRS7B	2,37	down	H95641	USPL1
2,78	up	H59231	0	2,37	down	AA464542	PTPRE
2,76	up	T59658	ANTXR2	2,36	down	H68845	PRDX2
2,76	up	N95358	MYO1B	2,36	down	T73558	DNASE1L3
2,73	up	AA456008	MLL11	2,35	down	H84154	CCND2
2,72	up	R23212	RAB8B	2,35	down	W88571	TRPV6
2,71	up	H72122	0	2,35	down	AA397813	CKS2
2,69	up	N95558	0	2,33	down	AA457725	GABARAP
2,68	up	N47113	ATAD2	2,32	down	AA416665	TRAPPC1
2,67	up	AA043228	CNN3	2,30	down	W74293	SNHG7
2,64	up	AA454572	0	2,29	down	AA521431	PFN1

KL1 DMSO -
LV DMSO

Fold change	direction	Genbank ID	Symbol	Fold change	direction	Genbank ID	Symbol	
2,63	up	N35259	C12orf30	2,28	down	H08548	ACLY	
2,62	up	H28344	TCEA1	2,27	down	T55407		0
2,62	up	R64153	KIAA1754	2,26	down	R53258	GTPBP9	
2,62	up	T61866	IPO7	2,25	down	W56590	CYB5D1	
2,61	up	N30986	SERPINE1	2,24	down	N59851	WASF1	
2,60	up	N49686	SEC61A2	2,23	down	R51052	RAB4A	
2,57	up	AA702548	EI24	2,23	down	H99502		0
2,57	up	AA069372	FOXD1	2,22	down	AA482119	ID3	
2,56	up	AA486092	CMTM7	2,21	down	AA477781	CYP51A1	
2,56	up	R78530	COTL1	2,21	down	AA457696	KATNB1	
2,54	up	AA054321	TRIM31	2,21	down	AA421819	CDH6	
2,54	up	R55620	DPAGT1	2,21	down	AA002086	CD1C	
2,54	up	W49619	CDH2	2,21	down	R22179	PAXIP1	
2,53	up	AA431753	GULP1	2,20	down	AA455925	FHL1	
2,53	up	R68805	STT3A	2,20	down	AA463961	WIPF2	
2,50	up	AA126265	CANX	2,19	down	AA071486	AURKB	
2,50	up	R21506	AKAP10	2,19	down	T56800		0
2,50	up	N62464	0	2,18	down	AA486444	WIBG	
2,49	up	N89721	PPP3CC	2,17	down	AA609009	PPME1	
2,49	up	AA456291	DRG2	2,17	down	H05099	KIAA0182	
2,49	up	N75979	SNX19	2,17	down	AA455910	F2R	
2,49	up	AA460152	PLK2	2,15	down	R21737	NUP155	
2,47	up	H88599	FAM3C	2,14	down	R77432	MPDU1	
2,47	up	AA283090	CD44	2,14	down	AA293571	FAS	
2,46	up	N21309	DCBLD2	2,14	down	N64139	LATS2	
2,46	up	AA620591	REEP3	2,14	down	R65573	TBC1D16	
2,45	up	AA293365	MAP2K4	2,13	down	AA253479	ANKRD46	
2,41	up	AA046528	ARPP-19	2,12	down	N53172		0
2,41	up	W65461	DUSP5	2,12	down	AA464743		0
2,39	up	R81782	CHD9	2,12	down	H73237	ARMC8	
2,37	up	N75572	SFT2D1	2,12	down	AA188378	RPL22L1	
2,36	up	W60718	0	2,11	down	AA490477	MYH10	
2,33	up	W37808	0	2,11	down	AA682293	PAH	
2,33	up	AA173189	TXNDC1	2,11	down	N68719		0
2,31	up	AA425806	DEAF1	2,11	down	N62620	KCNK1	
2,31	up	AA464741	DDX49	2,10	down	AA453750	STRA13	
2,30	up	W67174	0	2,10	down	T52700		0
2,30	up	H68988	0	2,09	down	R63682	ANKRA2	
2,29	up	AA127879	0	2,09	down	R00492		0
2,27	up	W47105	ELL2	2,09	down	T95274		0
2,27	up	R11669	C11orf60	2,09	down	AA405000	RNASSET2	
2,27	up	N34799	FOSL2	2,09	down	AA664077	ATP6V1F	
2,25	up	N30156	DCLRE1A	2,09	down	T99236		0
2,25	up	W55968	MBIP	2,08	down	AA463504		0
2,23	up	AA701502	0	2,08	down	AA504809	ASNA1	
2,23	up	AA448285	C14orf135	2,07	down	W72051	FABP7	
2,22	up	R06252	0	2,07	down	AA489011	ZNHIT3	
2,21	up	AA431438	DCBLD2	2,07	down	AA402754	EYA2	
2,21	up	W37721	FUT11	2,06	down	W02227	SFT2D3	
2,21	up	H51066	LEPR	2,06	down	AA394148	TOR1A	
2,20	up	AA150093	CRSP2	2,06	down	AA463213	PRKD3	
2,20	up	R31681	TM9SF3	2,06	down	H59916		0
2,20	up	H48096	0	2,06	down	N46240	SUMF2	
2,20	up	AA446822	LPIN1	2,05	down	N93695	GCAT	
2,18	up	AA496283	THY1	2,05	down	AA136040	DUSP14	
2,18	up	R38369	MARCH4	2,05	down	AA485357	UNQ501	
2,17	up	AA074535	PBXIP1	2,04	down	W69671	SETD4	
2,17	up	H99650	SEC22B	2,04	down	AA460859	BIRC5	
2,17	up	N68557	COQ9	2,03	down	T71353	C5orf26	
2,17	up	AA418077	GEM	2,03	down	AA448177	MGC4172	
2,16	up	H79130	GNA12	2,02	down	W87533	SLC39A5	
2,16	up	H28922	MCF2L	2,01	down	AA291513	BCL7B	
2,16	up	AA417279	SIRPA	2,01	down	N55205	HBBP1	
2,15	up	AA156781	0	2,01	down	H95989	SLC35B2	
2,14	up	H71857	0					
2,14	up	AA488900	RAPGEF2					

KL1 DMSO -
LV DMSO

Fold change	direction	Genbank ID	Symbol	Fold change	direction	Genbank ID	Symbol
2,13	up	R33116	0				
2,11	up	AA488367	KLHDC2				
2,11	up	AA630104	LIPA				
2,10	up	N30157	CANX				
2,09	up	H80865	0				
2,09	up	R12679	0				
2,08	up	R74169	LOC654342				
2,07	up	N95249	KRAS				
2,07	up	R70508	FEZ2				
2,06	up	R34694	TAF2				
2,05	up	AA115248	0				
2,05	up	R43352	0				
2,05	up	AA232647	VEZF1				
2,03	up	H82950	TRFP				
2,03	up	W31725	EXTL2				
2,02	up	H29215	ACSL3				
2,02	up	AA428029	LOC151579				
2,02	up	AA644088	CTSC				
2,02	up	AA456143	LZTS2				
2,01	up	AA405804	0				
2,01	up	R09069	GBE1				
2,01	up	N20989	ANTXR1				
2,00	up	AA431749	DCBLD1				
2,00	up	AA443119	PTRF				

KL1
Nutlin-3 -
LV
Nutlin-3

Fold change	direction	Genbank ID	Symbol	Fold change	direction	Genbank ID	Symbol
28,62	up	AA114966	WNT5B	35,02	down	N35290	CDKN1A
14,21	up	H77855	TRIM58	11,53	down	H12044	CYFIP2
9,63	up	W02083	LOC401320	9,35	down	AA598517	KRT8
9,45	up	H66070	0	8,65	down	AA464542	PTPRE
9,39	up	AA135809	0	7,85	down	AA016234	CPA4
9,33	up	R93124	AKR1C2	7,69	down	AA115076	CITED2
7,72	up	N70010	CDCA5	7,21	down	AA456298	HIST2H2BE
7,62	up	H58234	ATAD2	7,19	down	N53172	0
7,47	up	AA431741	MLF1IP	6,47	down	W69790	FILIP1L
7,30	up	AA456621	GGH	6,43	down	R01070	AIG1
7,06	up	AA187351	RRM2	6,38	down	N62516	0
6,86	up	W95041	HS3ST3B1	6,15	down	T67558	AIG1
6,79	up	AI039800	CDC2	5,99	down	AA431179	SLC35D2
6,77	up	N47113	ATAD2	5,79	down	T57834	0
6,54	up	AA131909	CEP55	5,74	down	R21737	NUP155
6,46	up	N54344	NCAPH	5,14	down	AA485353	LGALS3BP
6,10	up	AA430546	NCAPD3	4,82	down	AA088430	0
6,09	up	AA262212	DLG7	4,72	down	AA455910	F2R
6,08	up	R66925	0	4,39	down	AA478553	DCT
6,05	up	H95392	H2AFX	4,38	down	R65759	C6orf120
5,93	up	W96205	0	4,33	down	W15263	SLC26A2
5,91	up	H18428	0	4,32	down	AA459100	TPD52
5,78	up	N59438	HS3ST3A1	4,22	down	N63150	RCOR3
5,77	up	AA411850	CENPE	4,11	down	R70506	0
5,62	up	AA460299	MLF1IP	4,10	down	R44496	PLEKHA7
5,60	up	T66815	HIST1H1C	4,09	down	AA457710	POLD4
5,31	up	AA213393	CCNA2	4,09	down	AA630328	LGALS3
5,25	up	W46900	CXCL1	4,05	down	AA514409	MYC
5,24	up	AA458994	CCNA2	3,85	down	AA044267	P2RX5
5,20	up	N93924	RFC4	3,84	down	AA485357	UNQ501

KL1
Nutlin-3 -
LV
Nutlin-3

Fold change	direction	Genbank ID	Symbol	Fold change	direction	Genbank ID	Symbol
5.00	up	H47327	TACC1	3.73	down	AA293571	FAS
4.98	up	R96941	0	3.73	down	T71353	C5orf26
4.87	up	AA478066	PKMYT1	3.68	down	R53258	GTPBP9
4.84	up	H98248	0	3.45	down	N58170	NAT8
4.84	up	AA481076	MAD2L1	3.44	down	T55870	SLC20A2
4.82	up	N70544	0	3.43	down	AA416665	TRAPPC1
4.79	up	R78559	SF3B5	3.42	down	AA452933	0
4.75	up	AA486289	POLA2	3.40	down	AA938563	CCL2
4.75	up	AA405571	LOC339483	3.40	down	AA457725	GABARAP
4.67	up	AA488176	ARL6IP6	3.37	down	AA405000	RNASET2
4.58	up	AA056377	HMGB3	3.30	down	AA062814	0
4.35	up	T63980	0	3.28	down	T50370	C20orf119
4.24	up	R44018	CRY1	3.26	down	AA629542	WASF3
4.19	up	AA968443	CCNB1	3.20	down	H29485	SSB
4.09	up	N72697	ASF1B	3.20	down	T67544	PTPRE
4.02	up	N72115	CDKN2C	3.19	down	N93715	LOC284184
3.96	up	H21869	COX10	3.16	down	AA430654	ATP6V0A1
3.92	up	N72576	0	3.12	down	AA496147	TUSC2
3.90	up	H65449	TIAM1	3.08	down	AA115186	GTF2IP1
3.88	up	N35259	C12orf30	3.02	down	H38623	ATP5J2
3.85	up	T57082	EMP2	3.02	down	T60160	GABARAPL1
3.83	up	R06900	0	3.02	down	AA416970	MXD4
3.78	up	AA460859	BIRC5	3.02	down	AA458965	IL32
3.75	up	T98634	CCT4	3.01	down	H17051	RGS8
3.74	up	AA430032	PTTG1	3.01	down	AA188378	RPL22L1
3.73	up	R05801	MPO	2.98	down	T56021	CPD
3.73	up	W59987	NRBP1	2.98	down	AA598573	UNC84A
3.73	up	AA621315	CTNNAL1	2.97	down	AA425102	CCL2
3.72	up	AA291398	RCC1	2.95	down	AA032077	NDUFB6
3.70	up	AA490462	AEBP1	2.95	down	R96527	NCSTN
3.68	up	W73366	CBL	2.93	down	AA434391	NAB2
3.67	up	R38717	ENPP2	2.92	down	AA609009	PPME1
3.62	up	H94466	CENPE	2.92	down	H72028	GSN
3.60	up	T89996	0	2.88	down	AA625632	RPS27A
3.60	up	N69491	KIFC1	2.87	down	AA625666	LITAF
3.57	up	AA701455	CENPF	2.84	down	AA629923	NOMO3
3.56	up	H57850	PPP2R1B	2.81	down	T91067	LOC144233
3.51	up	AA489815	PRPF6	2.76	down	R62781	PVRL3
3.49	up	AA504204	POLD3	2.76	down	W47387	EVI5
3.47	up	AA490462	AEBP1	2.76	down	R67915	POMP
3.47	up	AA461108	EFNB2	2.76	down	R76394	PRSS23
3.45	up	W72814	C21orf45	2.75	down	H78613	LOC645513
3.41	up	N53351	RIT2	2.75	down	T63971	GPR116
3.40	up	AA426096	CHAF1B	2.73	down	AA284492	TSPAN3
3.40	up	R44417	BIRC2	2.72	down	AA434391	NAB2
3.38	up	AA157787	KNTC1	2.71	down	W56590	CYB5D1
3.36	up	AA464256	DTYMK	2.70	down	AA446013	RPL27A
3.34	up	AA045524	CGI-38	2.66	down	AA670429	0
3.29	up	AA159311	WHSC1	2.64	down	AA664077	ATP6V1F
3.29	up	R68805	STT3A	2.64	down	H10988	TNS1
3.27	up	R24543	NET1	2.62	down	AA454584	0
3.25	up	AA127879	0	2.61	down	T62844	MOSPD1
3.25	up	AA629558	SLBP	2.60	down	N69540	0
3.24	up	H79130	GNA12	2.60	down	R31110	0
3.23	up	AA425806	DEAF1	2.60	down	T48293	0
3.19	up	AA430504	UBE2C	2.59	down	AA436564	MERTK
3.18	up	H48533	BIRC3	2.59	down	N95226	GPR116
3.18	up	N51828	0	2.59	down	N52406	0
3.15	up	N25798	ANKRD28	2.58	down	R66605	ACTN4
3.15	up	AA446462	BUB1	2.58	down	AA496944	40787
3.12	up	AA430744	EZH2	2.57	down	N73536	UFM1
3.11	up	N24880	0	2.56	down	AA608713	C1QDC1
3.09	up	R25398	0	2.56	down	AA490477	MYH10
3.09	up	N89721	PPP3CC	2.55	down	T95274	0

KL1 Nutlin-3 - LV Nutlin-3							
Fold change	direction	Genbank ID	Symbol	Fold change	direction	Genbank ID	Symbol
3,00	up	N62384	0	2,50	down	R60807	FLJ39378
3,00	up	AA479781	RDX	2,49	down	AA069704	TOMM7
2,98	up	N73309	SSR3	2,49	down	AA083478	TRIM22
2,96	up	AA458994	CCNA2	2,49	down	H63532	GABRE
2,96	up	H71857	0	2,48	down	T99236	0
2,95	up	AA034501	SLC35A3	2,47	down	AA190629	ASNSD1
2,94	up	AA397813	CKS2	2,46	down	AA041400	LRBA
2,93	up	R62612	FN1	2,46	down	R63682	ANKRA2
2,93	up	H15112	UNG	2,46	down	R99084	C6orf203
2,93	up	AA663995	MCM6	2,44	down	AA400292	DAB2
2,92	up	N33274	PAICS	2,42	down	H81940	POM121
2,90	up	R52786	WDR16	2,41	down	AA004881	RETSAT
2,89	up	AA088458	C9orf140	2,40	down	AA458884	S100A2
2,89	up	T81400	KIAA0286	2,40	down	T57803	EDIL3
2,86	up	W86282	RND3	2,40	down	AA460314	0
2,84	up	N95558	0	2,39	down	AA630104	LIPA
2,84	up	H23985	PARP2	2,39	down	AA062805	SDHC
2,83	up	N49686	SEC61A2	2,38	down	AA176483	LASS5
2,83	up	AA427621	TMEM19	2,38	down	H51645	CAPN12
2,82	up	AA598668	CHN1	2,38	down	AA448189	SPATA20
2,82	up	AA402879	DDX12	2,37	down	AA485443	RNF41
2,82	up	AA427899	TUBB	2,37	down	AA012939	LOC137886
2,79	up	H59259	RPA3	2,36	down	T55407	0
2,79	up	AA456143	LZTS2	2,35	down	H75632	0
2,78	up	AA447514	0	2,34	down	H00662	SELL
2,77	up	H93087	HMG2	2,34	down	T60926	METTL7B
2,77	up	AA452909	NR2F1	2,34	down	AA446011	0
2,76	up	W55968	MBIP	2,34	down	AA404239	ENAH
2,76	up	H97000	H2AFV	2,33	down	N63567	PKD3
2,75	up	T40891	C10orf6	2,32	down	AA429657	SYT11
2,73	up	AA630734	SARS	2,32	down	AA504858	FBXO8
2,73	up	T53404	LOC57228	2,31	down	AA428334	GSTZ1
2,72	up	AA459293	TMEM23	2,31	down	AA447569	NDUFAB1
2,71	up	AA446881	ZNF608	2,31	down	R51052	RAB4A
2,70	up	AA460685	BIRC5	2,30	down	AA453742	SLC1A3
2,69	up	AA009484	CRCT1	2,30	down	N68463	AKAP12
2,69	up	AA402879	DDX12	2,30	down	R06840	GGTL3
2,68	up	R07296	SOAT1	2,29	down	N91584	RPS6
2,68	up	AI078013	DNMT1	2,29	down	AA598510	APRT
2,67	up	W60718	0	2,29	down	W35416	0
2,67	up	AA488188	RQCD1	2,29	down	R26827	PDCD4
2,66	up	AA186327	0	2,28	down	AA448177	MGC4172
2,66	up	AA456291	DRG2	2,28	down	T71991	CREG1
2,63	up	N95249	KRAS	2,28	down	R45640	HBEGF
2,63	up	AA136049	CACNA1C	2,28	down	H29475	PKD2
2,63	up	AA521347	0	2,27	down	AA482119	ID3
2,63	up	AA454572	0	2,27	down	AA191356	MIR16
2,60	up	N36421	0	2,27	down	AA703141	EPB41
2,58	up	AA701502	0	2,27	down	AA443585	KIAA0913
2,57	up	R71691	TRAF1	2,26	down	AA490902	GUK1
2,56	up	R11669	C11orf60	2,26	down	AA431201	EP400NL
2,56	up	AA464532	THBS1	2,26	down	AA434406	TAX1BP3
2,56	up	N59764	LOC728564	2,25	down	AA457261	SLC44A1
2,54	up	AA487213	RQCD1	2,25	down	AA485959	KRT7
2,54	up	W94295	ADAMTS6	2,24	down	H96850	0
2,54	up	H10788	CIT	2,24	down	AA424516	SORL1
2,53	up	#767	0	2,23	down	H18427	0
2,53	up	R99346	RBM17	2,23	down	N23299	0
2,52	up	R47979	HLA-DRA	2,22	down	T68464	C5orf33
2,52	up	R19158	AURKA	2,22	down	AA459305	PLOD3
2,52	up	R02069	HNRPH3	2,22	down	N95418	FKBP8
2,51	up	N69286	C1orf21	2,22	down	AA453580	TRIM11
2,51	up	AA486194	ZWILCH	2,21	down	AA464246	HLA-B
2,50	up	AA430625	DPYD	2,21	down	H99502	0

KL1
Nutlin-3 -
LV
Nutlin-3

Fold change	direction	Genbank ID	Symbol	Fold change	direction	Genbank ID	Symbol
2,49	up	AA486418	DNAH11	2,19	down	AA147640	PYGL
2,46	up	N75979	SNX19	2,18	down	AA235597	SMAD6
2,46	up	R39861	RPA2	2,18	down	AA457155	ZNF212
2,45	up	AA457140	DHRS7B	2,18	down	AA463961	WIPF2
2,45	up	AA186804	ERO1L	2,18	down	AA449440	IFNGR2
2,44	up	AA974707	EGFR	2,18	down	AA485424	BET1L
2,44	up	AA486089	NAV1	2,18	down	T70337	LOC653190
2,44	up	AA463958	PIGK	2,18	down	AA457726	MLF2
2,44	up	AA419238	RARB	2,17	down	H62838	0
2,43	up	N90109	NCL	2,17	down	H29322	CAMK1
2,43	up	AA043878	NAV1	2,16	down	AA490039	NRAS
2,43	up	N71438	0	2,16	down	H71881	CAMTA1
2,42	up	N23996	SWAP70	2,16	down	AA481780	CA3
2,42	up	AA433898	DLGAP4	2,15	down	AA002086	CD1C
2,42	up	AA004675	0	2,15	down	R54665	SERPINB1
2,40	up	T67557	DGCR8	2,15	down	H84982	CHES1
2,39	up	T64483	TNIP1	2,14	down	R06567	0
2,38	up	T59043	AFP	2,14	down	AA132086	C6orf108
2,37	up	AA019203	0	2,14	down	AA670357	0
2,37	up	R94693	0	2,13	down	AA453994	RHBDD2
2,35	up	AA478036	BMI1	2,13	down	H80865	0
2,34	up	H20558	ARL6IP1	2,13	down	N64139	LATS2
2,34	up	AA431749	DCBLD1	2,13	down	AA485974	GOLGB1
2,34	up	H68272	RQCD1	2,13	down	R16902	RBPJ
2,34	up	R21506	AKAP10	2,13	down	N73091	RPS23
2,33	up	AA424503	PSMC6	2,13	down	T49802	C11orf48
2,33	up	R74169	LOC654342	2,13	down	N54526	ZNF525
2,33	up	AA457152	TAF9B	2,13	down	N63312	0
2,32	up	AA448667	CBX1	2,12	down	AA429483	MRPS21
2,32	up	AA598887	SMC1A	2,12	down	AA460301	POLR1D
2,30	up	AA134824	SCN3B	2,12	down	AA410404	DDB2
2,30	up	N52078	0	2,12	down	W93317	LOC124446
2,30	up	AA007518	SMAD6	2,12	down	AA025421	C21orf33
2,29	up	N20593	NAT13	2,10	down	R58948	TSPAN17
2,29	up	AA469953	NUP50	2,10	down	R38198	QDPR
2,28	up	AA497002	MCAM	2,09	down	AA464600	MYC
2,28	up	W90705	BMI1	2,09	down	AA504342	VDP
2,27	up	AA126982	0	2,09	down	H93552	C20orf30
2,27	up	N69460	UBQLN1	2,09	down	AA460731	GPR107
2,26	up	AA173189	TXNDC1	2,09	down	R77432	MPDU1
2,25	up	AA497027	M-RIP	2,08	down	N45100	ZEB2
2,25	up	W90323	C6orf173	2,08	down	N95761	FUCA1
2,25	up	H11092	STX2	2,08	down	T47443	PROCR
2,25	up	AA457025	LMNB2	2,08	down	AA065090	MALAT1
2,24	up	N69393	CDV3	2,08	down	R06417	JUP
2,24	up	R08271	CXorf6	2,08	down	AA017383	SND1
2,23	up	R93507	CCDC47	2,08	down	N45313	SNX22
2,23	up	AA443998	NUDT1	2,07	down	W81191	SC65
2,23	up	H29215	ACSL3	2,07	down	N30986	SERPINE1
2,23	up	H08595	SSX2IP	2,07	down	AA598583	CYFIP1
2,22	up	AA007522	VRK1	2,07	down	W44558	AP1S1
2,22	up	R34240	0	2,06	down	AA428058	NDUFB7
2,22	up	N94372	NCKIPSD	2,06	down	R17676	PLXNA1
2,20	up	AA010065	CKS2	2,05	down	T90369	0
2,19	up	AA463411	SMC3	2,05	down	H18440	ZFYVE1
2,18	up	H73234	CDC42EP1	2,05	down	H80263	0
2,18	up	AA043944	EVI1	2,05	down	AA598653	POSTN
2,17	up	W93520	NAT13	2,05	down	AA026054	LYK5
2,17	up	H24301	RBBP8	2,04	down	R59697	CDK8
2,17	up	AA136060	PCGF5	2,04	down	H25547	0
2,17	up	R01227	UBE2J1	2,04	down	W31675	PRKXP1
2,16	up	AA004868	0	2,04	down	AI149381	IGFBP2
2,15	up	AA489329	DYNC1LI1	2,04	down	H73237	ARMC8
2,15	up	N75572	SFT2D1	2,03	down	H95065	TMEM134

KL1
Nutlin-3 -
LV
Nutlin-3

Fold change	direction	Genbank ID	Symbol	Fold change	direction	Genbank ID	Symbol
2,14	up	AA284528	PRSS1	2,02	down	AA504809	ASNA1
2,14	up	T91091	INSIG2	2,01	down	AA412500	TCEA2
2,13	up	AA418846	MAST4	2,01	down	H54686	DAB2
2,12	up	H11720	SFRS10	2,00	down	AA486444	WIBG
2,12	up	R97785	TOPBP1	2,00	down	R64101	0
2,11	up	R97014	0	2,00	down	AA424695	ITGA3
2,11	up	N57002	0	1,99	down	W88497	GSTK1
2,10	up	AA402345	CCND3	1,99	down	AA405901	NDUFA3
2,10	up	H99811	HNRPA3	1,99	down	AA019748	ARNT2
2,09	up	H28344	TCEA1	1,99	down	AA488087	0
2,09	up	H24309	0	1,99	down	R93543	ENAH
2,09	up	AA455111	HNRPC	1,99	down	N52646	UBAP2L
2,09	up	T99639	KHSRP	1,98	down	AA487457	EIF4EBP2
2,09	up	R60723	P2RX4	1,98	down	T49854	LOC401152
2,09	up	H15718	AXL	1,98	down	H08732	GYS1
2,08	up	H98134	0	1,98	down	AA425769	ALG5
2,08	up	R59197	RAD18	1,97	down	AA054954	0
2,07	up	AA489678	0	1,97	down	AA464700	THADA
2,07	up	H48096	0	1,97	down	N31716	LOC644096
2,07	up	H91651	GABPB2	1,96	down	AA452848	AAMP
2,07	up	N69107	YWHAH	1,96	down	H05099	KIAA0182
2,07	up	R38261	LOC283624	1,96	down	H16829	HEATR5B
2,06	up	AA608730	HBS1L	1,96	down	R33122	BIVM
2,06	up	AA136283	BACE1	1,95	down	AA412250	0
2,06	up	AA127058	MTDH	1,95	down	AA670215	TSG101
2,06	up	R07607	0	1,95	down	AA664284	UQCRB
2,06	up	N70013	RP2	1,95	down	R52961	SHC1
2,06	up	AA022886	PITPNC1	1,95	down	AA136040	DUSP14
2,05	up	AA521422	THAP11	1,95	down	AA446028	PON2
2,05	up	AA447525	DZIP1	1,94	down	T57919	ETFA
2,05	up	N20072	RPIA	1,94	down	AA608536	IKBKAP
2,04	up	AA430035	RTN3	1,94	down	AA479906	ZNF219
2,04	up	R28649	0	1,94	down	H53038	0
2,04	up	AA620591	REEP3	1,94	down	T46897	ADRM1
2,03	up	H96241	GABPA	1,94	down	AA449678	PNPLA4
2,03	up	AA678295	BARD1	1,93	down	W02116	WDR42A
2,03	up	T96083	RAB31	1,93	down	H68845	PRDX2
2,03	up	H38110	0	1,93	down	T49222	TMEM129
2,03	up	R94943	PSMC6	1,93	down	R55251	GCN1L1
2,03	up	R55620	DPAGT1	1,93	down	H99930	C6orf113
2,02	up	R68581	RNASEH2B	1,93	down	AA058323	IFITM1
2,02	up	T72671	0	1,93	down	AA464743	0
2,02	up	T98559	0	1,92	down	N55540	ANKRD38
2,02	up	H24688	SMARCC2	1,92	down	N90806	C5orf23
2,01	up	AA479933	C1orf41	1,92	down	AA186348	PNPLA6
2,01	up	N68557	COQ9	1,92	down	T89391	CAV2
2,00	up	AA456630	ARHGEF18	1,92	down	AA452872	0
2,00	up	AA132007	DR1	1,91	down	W80632	0
2,00	up	H73714	0	1,91	down	AA131760	P15RS
1,99	up	H17520	0	1,91	down	H42247	RXRB
1,99	up	AA496576	0	1,91	down	T41078	BAZ2B
1,99	up	AA113881	UBE2G1	1,91	down	R52526	MAPRE3
1,99	up	T72825	C7orf36	1,91	down	AA496997	LMNA
1,98	up	N53449	RAD52	1,91	down	AA478959	PARP4
1,98	up	W42674	FKBP14	1,91	down	AA401479	CDK5
1,97	up	N72585	0	1,91	down	AA457153	ZNF282
1,97	up	N62464	0	1,91	down	AA459690	0
1,96	up	AA451895	ANXA5	1,91	down	W72201	SMAD3
1,95	up	H94469	NUP85	1,90	down	R32450	NPEPPS
1,95	up	W46415	SHB	1,90	down	AA425320	DNAJB9
1,95	up	#840	0	1,90	down	AA496628	NME1
1,95	up	AA410896	GPSM3	1,90	down	AA668301	RPS16
1,94	up	N75581	FUBP1	1,89	down	AA430654	ATP6V0A1
1,94	up	W46964	C9orf21	1,89	down	N94921	ROR2

KL1
Nutlin-3 -
LV
Nutlin-3

Fold change	direction	Genbank ID	Symbol	Fold change	direction	Genbank ID	Symbol
1,93	up	T55871	HKDC1	1,88	down	T67223	0
1,93	up	H95655	0	1,88	down	N26536	ATP7B
1,93	up	R99331	ZNF650	1,88	down	AA018591	SPTBN1
1,93	up	T65790	FDPS	1,88	down	AA430668	FCGRT
1,93	up	T98612	0	1,88	down	H53572	PEX11A
1,92	up	N98509	ACSL3	1,88	down	R65573	TBC1D16
1,92	up	N39195	KDELC1	1,87	down	AA496106	DNAJB6
1,92	up	H64325	SOS1	1,87	down	W35283	BOLA2
1,92	up	N73861	0	1,87	down	R44927	0
1,91	up	H38210	TUBB	1,86	down	AA460732	ZNF521
1,91	up	N27190	UCHL3	1,86	down	T99017	0
1,90	up	AA434409	ABCB10	1,86	down	AA447394	MBTPS1
1,90	up	AA031770	NUDT21	1,86	down	AA459266	PMS2L1
1,90	up	N73827	ACSM3	1,86	down	AA448001	TBPL1
1,90	up	AA029757	PCTP	1,86	down	H08749	MAP2K3
1,90	up	H11036	PPM2C	1,86	down	AA425861	ECH1
1,90	up	T57815	WDR57	1,86	down	AA683073	SYT1
1,90	up	H51377	0	1,85	down	H94332	FANCC
1,90	up	AA669443	EIF5	1,85	down	H97765	C12orf52
1,90	up	T61899	0	1,85	down	AA055835	CAV1
1,89	up	AA431773	FADS1	1,85	down	H25546	SAA1
1,89	up	H47069	0	1,85	down	AA699560	SURF1
1,89	up	AA459109	MTFR1	1,85	down	R99911	YIPF6
1,89	up	H59620	INSIG1	1,85	down	N93053	NDUFB5
1,89	up	T98152	FBN2	1,85	down	AA455925	FHL1
1,88	up	AA457700	SCD	1,84	down	AA135135	KLHL12
1,88	up	H38804	0	1,84	down	AA495944	WDR68
1,88	up	H73337	LIN7C	1,84	down	W45518	SLC4A2
1,88	up	AA152303	0	1,83	down	R46837	UQCR
1,88	up	AA459868	UBE2E3	1,83	down	H17024	0
1,88	up	AA464965	TSR2	1,83	down	N45139	0
1,88	up	AA159900	FLJ14959	1,83	down	H18913	SYT12
1,88	up	R53787	PPP2R5E	1,82	down	R48169	UBE2Q1
1,88	up	N25945	PLSCR1	1,82	down	AA478585	BTN3A3
1,88	up	W63749	BCL2	1,81	down	AA054287	RBM3
1,88	up	AA448285	C14orf135	1,81	down	AA455956	SLAH1
1,87	up	AA279429	ECE1	1,81	down	H08548	ACLY
1,87	up	AA453813	ST3GAL4	1,80	down	AA431438	DCBLD2
1,87	up	N66942	PGRMC1	1,80	down	R32875	FBXL12
1,87	up	N50745	APITD1	1,80	down	H14805	0
1,86	up	AA120875	EPC1	1,80	down	AA418694	ATOX1
1,86	up	W72167	TSPAN5	1,80	down	N54848	0
1,86	up	AA159578	LRIG1	1,79	down	AA676998	TMPO
1,86	up	H60691	FAM105B	1,79	down	W73797	EDEM2
1,86	up	H99695	CDV3	1,79	down	AA521431	PFN1
1,85	up	W60015	EIF2S1	1,79	down	AA136527	POLR1D
1,85	up	N95358	MYO1B	1,79	down	N62586	ERCC5
1,85	up	AA046528	ARPP-19	1,79	down	AA421296	CD68
1,85	up	W04502	C11orf57	1,79	down	H95641	USPL1
1,85	up	AA629262	PLK1	1,79	down	AA677655	KL
1,84	up	N93582	PERQ1	1,78	down	R72518	SCAMP3
1,84	up	H48099	RSPRY1	1,78	down	N40554	0
1,84	up	R68631	THRAP1	1,78	down	R17618	TUBB
1,84	up	AA629686	EED	1,78	down	R65792	ECHDC1
1,84	up	N79612	0	1,78	down	W47353	RPS6KB2
1,84	up	H59204	CDC6	1,78	down	H14343	CDC25B
1,84	up	R23212	RAB8B	1,78	down	H99364	CLCN7
1,84	up	T63998	GNA11	1,78	down	AA158162	TUT1
1,84	up	N95752	ZCD2	1,78	down	AA497001	FLJ20920
1,84	up	R59556	TELO2	1,77	down	AA456570	IRF3
1,83	up	AA455497	CCDC80	1,77	down	AA620580	PSMB3
1,83	up	R62612	FN1	1,77	down	AA063637	PPT1
1,83	up	AA443602	CUEDC1	1,77	down	R74078	0
1,83	up	AA464528	PLP2	1,76	down	AA088749	CIDEA

KL1
Nutlin-3 -
LV
Nutlin-3

Fold change	direction	Genbank ID	Symbol	Fold change	direction	Genbank ID	Symbol
1,82	up	R06263	HMBS	1,76	down	AA455298	DNAJB2
1,82	up	T66839	ZC3H14	1,76	down	AA149882	ODF2
1,82	up	N70122	ATP6V0A2	1,76	down	N72307	RIPK5
1,82	up	N95435	GPR176	1,75	down	R06254	TPD52L2
1,82	up	AA417283	RBM14	1,75	down	AA455507	NSUN5C
1,82	up	H99736	0	1,75	down	H63361	0
1,82	up	AA284495	MESDC2	1,75	down	AA490213	TOB1
1,81	up	AA398011	DYNLT3	1,75	down	AA490996	IFI16
1,81	up	H62894	0	1,75	down	AA405748	U2AF2
1,81	up	N79484	ECM1	1,75	down	H82992	PIGT
1,81	up	W67134	RGS12	1,74	down	AA434068	TERF2IP
1,81	up	N36130	0	1,74	down	AA670107	TRA@
1,80	up	AA446361	0				
1,80	up	N50948	LOC399818				
1,80	up	R14855	FBXO34				
1,80	up	R54855	LOC153222				
1,80	up	AA487433	ZXDC				
1,80	up	W67309	SAR1B				
1,80	up	H63947	CSNK2A2				
1,80	up	AA490538	ZFP161				
1,80	up	T50082	SLC25A37				
1,79	up	T58773	0				
1,79	up	AA150015	FAM44B				
1,79	up	H52950	GAPDH				
1,79	up	T62072	YEATS4				
1,79	up	AA626698	TUBA3D				
1,79	up	W70062	FAF1				
1,78	up	AA012867	ARF6				
1,78	up	AA453273	LSM5				
1,78	up	R63623	DYRK2				
1,78	up	AA429661	POLD1				
1,78	up	W95051	IMMT				
1,77	up	AA009840	CHPT1				
1,77	up	R78530	COTL1				
1,77	up	AA437140	ANKRD27				
1,77	up	AA063521	0				
1,77	up	R42630	PCSK1				
1,77	up	AA100613	RRS1				
1,77	up	AA121266	PPP3CA				
1,77	up	R16539	0				
1,77	up	AA001749	MAPRE1				
1,77	up	AA055632	0				
1,77	up	H77399	PKNOX1				
1,76	up	R64153	KIAA1754				
1,76	up	AA446822	LPIN1				
1,76	up	T59641	PBX2				
1,75	up	AA450123	ENO2				
1,75	up	W57983	PNN				
1,75	up	AA598840	PHC2				
1,75	up	W49799	TAGLN3				
1,75	up	N33030	PIGS				
1,75	up	AA599104	C6orf148				
1,75	up	AA443094	TOMM40				
1,75	up	N89756	SLK				
1,74	up	AA630298	PTK2				
1,74	up	R39148	XRCC4				
1,74	up	W32511	TNPO1				

12. AKADEMISCHE LEHRER

Meine akademischen Lehrer während meines Studiums an der Philipps-Universität Marburg waren die Damen und Herren:

Aumüller, Boche, Cetin, Daut, Eilers, Elsässer, Feuser, Frenking, Garten, Grzeschik, Hartmann, Jungclas, Kirchner, Knöller, Kontermann, Koolman, Kuhn, Kunz, McGregor, Melsheimer, Müller, Müller-Brüsselbach, Moll, Niessing, Rhieder, Rogausch, Schäfer, Seitz, Slater, Suske, Tampé, Voigt, von Löw, Westermann

Meine akademischen Lehrer während meiner Auslandspraktika waren Frau Noel an der Universität Lüttich, Belgien sowie Herr Chiu an der Universität Maastricht, Niederlande.

13. DANKSAGUNG

Der praktische Teil dieser Arbeit zu Kaiso Like 1 erfolgte im Zeitraum von November 2005 bis Mai 2007. An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben:

Ich bedanke mich sehr bei Prof. Dr. Martin Eilers für die Bereitstellung des interessanten Themas und seine Hilfestellungen bei der Durchführung dieser Arbeit. Ich danke Dr. Axel Weber für die gute Zusammenarbeit. Ich danke Prof. Dr. Holger Christiansen für Anregungen aus medizinischer Sicht zu diesem Projekt. Zudem bedanke ich mich herzlich bei Prof. Dr. Uta-Maria Bauer, die mich besonders in der Anfangsphase meiner Arbeit sehr unterstützt hat und neben Prof. Dr. Martin Eilers und Prof. Dr. Rolf Müller Mitglied meines Thesis Committees war.

Herzlich bedanken möchte ich mich auch bei allen derzeitigen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Eilers für eine sehr schöne Zeit: Besonders bei Steffi Herold, Caroline Bouchard und Nikita Popov für die wissenschaftliche Unterstützung, Doris Dobrin und Michael Neuhaus für gelegentliche exzellente technische Unterstützung, bei Nicole Forster und Tobias Otto für Hilfe bei den FACS-Analysen. Ferner bei Sovana Adhikary, Axel Badouin, Hannelore Ballach, Sandra Bernard, Bernd Berwanger, Vincent Beuger, Uschi Eilers, Antje Grzeschiczek, Karin Hackelberg-Beimborn, Andrea Heiler, Barbara Herkert, Andreas Hock, Martina Janowski, Bianca Jebavy, Till Kortüm, Theresia Kress, Walter Lauer, Maria Llamazares, Werner Lutz, Judith Müller, Jean-François Naud, Katrin Nowak, Viola Paulus, Inge Pelz, Jens-Peter Reese, Lars Schüttrumpf, Sven Starke, Michael Wanzel, Birgit Samans und bei der AG Krause sowie der AG Bauer. Und natürlich bei Mona Meyer für ihre Freundschaft!

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meiner großartigen Familie für viel Geduld und Unterstützung bedanken, insbesondere bei Robrecht, meiner Mutter sowie Désirée und Manfred.

14. EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „Identifizierung von Kaiso Like 1 (Zbtb4) als negativem Regulator der *P21CIP1*-Expression, Interaktionspartner von Miz1 und Histondeacetylasen sowie Modulator der zellulären p53-Antwort“ im Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Martin Eilers ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Vorliegende Arbeit wurde in folgendem Publikationsorgan veröffentlicht:

- Weber A, Marquardt J*, Elzi D, Forster N, Starke S, Glaum A, Yamada D, Defossez PA, Delrow J, Eisenman RN, Christiansen H, Eilers M. (2008). Zbtb4 represses transcription of *P21CIP1* and controls the cellular response to p53 activation. EMBO J. 27, 1563-74.
- Weber A, Marquardt J, Starke S, Eilers M, Christiansen H. The downregulation of Kaiso-Like-1 (KL1/Zbtb4) contributes to chemotherapy resistance in neuroblastoma cell lines by derepression of p21^{cip1}. European J of Pediatrics, 2007 March, Vol.166(3):286 (oral presentation: 43rd Workshop for Pediatric Research, Göttingen, March 1.-2. 2007).
- Marquardt J, Weber A, Holger Christiansen H, Eilers M. Zbtb4 – a new heterodimeric binding partner of Miz-1. 6th ISREC conference on cancer research, October 11-13 2006, Lausanne/Switzerland.

Weitere Publikationen:

- Bouchard C, Marquardt J*, Brás A, Medema RH, Eilers M (2004). Myc-induced proliferation and transformation require Akt-mediated phosphorylation of FoxO Proteins. EMBO J. 23, 2830-2840.

* Co-Erstautorenschaft

Judith Schmitz

Heimbach, den 25. Juli 2009